



# Charakterisierung von Interleukin-6-Rezeptor- spezifischen Aptameren

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Eileen Magbanua**  
aus Hamburg  
2011



Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2007 bis September 2011 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Department Chemie des Fachbereichs für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn
2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhardt Bredehorst

Tag der Disputation: 9.12.2011

Für meine Eltern

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>VIII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Zytokin Interleukin-6 und der Interleukin-6-Rezeptor</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die klassische IL-6-vermittelte Signalübertragung	5
1.1.2 Trans-Signaling	7
1.1.3 Die Rolle des IL-6 bei Krankheiten	8
1.1.4 Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6	9
<b>1.2 Aptamere</b>	<b>10</b>
1.2.1 Aptamer-vermittelte Wirkstoffübertragung in Zellen	11
1.2.2 Interleukin-6-Rezeptor-bindende Aptamere	14
1.2.2.1 Das IL-6R-bindende RNA-Aptamer	14
1.2.2.2 Das IL-6R-bindende DNA-Aptamer	14
1.2.3 HIV-1 Integrase Inhibitoren	15
<b>1.3 G-Quadruplex-Strukturen</b>	<b>16</b>
1.3.1 Natürlich vorkommende G-Quadruplexe	17
1.3.2 Nachweis von Quadruplex-Strukturen	19
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Chemikalien</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Puffer und Medien</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Nucleotide und Oligonucleotide</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Proteine und Enzyme</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Fluorophore</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Kits und Säulen</b>	<b>26</b>
<b>3.8 Zelllinien</b>	<b>26</b>
<b>3.9 Bakterienstamm</b>	<b>27</b>
<b>3.10 Vektoren</b>	<b>27</b>
<b>3.11 Protein und DNA-Marker</b>	<b>27</b>
<b>4. METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Präparation von Nucleinsäuren</b>	<b>28</b>
4.1.1 <i>In vitro</i> T7-Transkription	28
4.1.2 Elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren in Polyacrylamidgelen	28
4.1.3 Isolierung von RNA- und DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	29
4.1.4 Nucleinsäurepräzipitation über Isopropanol	29
4.1.5 Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration	29
<b>4.2 Modifikation von RNA und DNA</b>	<b>30</b>
4.2.1 Dephosphorylierung von RNA	30
4.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	30
4.2.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonucleotiden mittels T4-Polynucleotidkinase	30
4.2.4 Radioaktive 3'-Endmarkierung von RNA mittels T4-RNA-Ligase	31
4.2.5 Radioaktive Markierung über <i>in vitro</i> T7-Transkription	31
4.2.6 Isolation von radioaktiv markierten RNA- und DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	32
<b>4.3 Methoden zur Charakterisierung von Aptameren</b>	<b>32</b>
4.3.1 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	32

<b>4.4</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Aptamer-Protein-Interaktionen</b>	<b>33</b>
4.4.1	Filterbindungsanalyse	33
4.4.2	Oberflächenplasmonresonanz-Analyse	33
4.4.3	HIV-1 Integrase Inhibitionsanalyse	34
4.4.4	Crosslink von Aptameren und Proteinen	35
4.4.4.1	Crosslink mit DSS	35
4.4.4.2	Crosslink mit SPDP	36
4.4.4.3	Crosslink mit Sulfo-SMCC	37
4.4.5	Nachweis des Crosslinkings zwischen Aptamer und Protein	37
4.4.6	Konjugation von Streptavidin mit biotinylierten Oligonucleotiden und/oder Fluorophoren	38
<b>4.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>39</b>
4.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	39
4.5.2	Trypsinierung adhärent-wachsender Zellen	39
4.5.3	siRNA-Transfektion eukaryotischer Zellen	39
4.5.4	Protein-Transfektion eukaryotischer Zellen	40
4.5.5	Proliferationstest	40
4.5.6	Stimulation von Zielzellen durch Aptamerbindung	40
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung von Aptamer-Target-Interaktionen</b>	<b>41</b>
4.6.1	Durchflusszytometrie	41
4.6.1.1	Immunologischer Nachweis von Rezeptoren auf Zelloberflächen	41
4.6.1.2	Bindung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Zelloberflächen	42
4.6.1.3	Internalisierung von fluoreszenzmarkierten Aptameren	42
4.6.2	Fluoreszenzmikroskopie	42
<b>4.7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>42</b>
4.7.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	42
4.7.2	Proteinreinigung	43
4.7.3	Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen	43
4.7.4	Coomassiefärbung	43
4.7.5	Silberfärbung	44
4.7.6	Western-Blot-Analyse	44
4.7.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
<b>4.8</b>	<b>Fluoreszenzspektroskopie</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung von IL-6-Rezeptor-spezifischen DNA-Aptameren</b>	<b>46</b>
5.1.1	Analyse der Interaktion zwischen hIL-6R-bindenden DNA-Aptameren und Hyper-IL-6	48
5.1.1.1	Auswirkung des Basen-Austausches auf die Quadruplex-Struktur des IL-6R-bindenden AID-1-Aptamers	49
5.1.2	Charakterisierung des IL-6R-spezifischen DNA-Aptamers AID-1 als RNA-Variante	59
5.1.2.1	Analyse der Bindung des AID-1-RNA-Variante an Hyper-IL-6 mittels Filterbindungsanalyse	59
5.1.2.2	Strukturanalyse des RNA-Aptamers AIR-1 mittels CD-Spektroskopie	62
5.1.3	Analyse der Bindung IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere an dessen Domäne D3	65
5.1.4	Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von DNA-Aptameren an IL-6R-tragende Zellen	66
5.1.5	Dimerisierung des IL-6R-bindenden DNA-Aptamers AID-1	67
5.1.5.1	Analyse der Interaktion zwischen ausgewählten Dimeren des DNA-Aptamers AID-1 an Hyper-IL-6 mittels Bindungsstudien	69
5.1.5.2	Interaktion zwischen AID-1-Dimeren und IL-6R-tragenden Zellen	71
5.1.5.3	Bestimmung der Bindungsspezifität des Dimer2Side durch Konkurrenz mit unmarkiertem IL-6R-spezifischen AIR-3A	73
5.1.5.4	Mikroskopische Visualisierung der Interaktion zwischen ausgewählten Dimer-Konstrukten und Baf_gp130_hIL-6R-Zellen	74
5.1.5.5	Internalisierung von Dimer2Side in Baf_gp130_hIL-6R-Zellen	76
5.1.5.6	Bindung der AID-1-Variante Dimer2Side an Hyper-IL-6 mittels SPR-Spektroskopie	77
5.1.5.7	Einfluss der Dimere auf den IL-6-Signalweg	79

<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung von IL-6R-spezifischen RNA-Aptameren</b>	<b>81</b>
5.2.1	Analyse der Struktur des RNA-Aptamers AIR-3A über Zirkulardichroismus	81
5.2.2	Interaktion zwischen dem RNA-Aptamer AIR-3A und IL-6-Rezeptor-tragenden Zellen	83
5.2.2.1	Gelelektrophoretische Trennung fluoreszenzmarkierter RNAs	83
5.2.2.2	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Baf_gp130_hIL-6R-Zellen	83
5.2.2.3	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an U937-Zellen	85
5.2.2.4	Interaktion zwischen dem RNA-Aptamer AIR-3A und U937-Zellen	86
5.2.2.5	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an HeLa-Zellen	87
5.2.2.6	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an HepG2-Zellen	88
5.2.3	Analyse der Interaktion zwischen dem RNA-Aptamer AIR-3A und Zelllinien ohne humane IL-6R	89
5.2.3.1	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Baf_gp130-Zellen	89
5.2.3.2	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Hek293-Zellen	90
5.2.4	Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A in IL-6-R-tragende Zellen	90
5.2.4.1	Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A in Baf_gp130_hIL-6R-Zellen	91
5.2.4.2	Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A in U937-Zellen	95
5.2.5	Einfluss der RNA-Aptamere auf das IL-6-Signaling	97
<b>5.3</b>	<b>Interaktion von IL-6R-bindenden Aptameren und der HIV-1 Integrase</b>	<b>98</b>
<b>5.4</b>	<b>Verwendung der IL-6R-bindenden Aptamere als zellspezifische Carrier</b>	<b>101</b>
5.4.1	Untersuchung von Aptamer-siRNA-Chimären	102
5.4.2	Analyse der Interaktion von Aptamer-Streptavidin-Konjugaten mit IL-6R-tragenden Zellen	103
5.4.2.1	Bestimmung des zu konjugierenden Fluorophors	103
5.4.2.2	Bindung und Internalisierung des Aptamer-Streptavidin-Fluorophor-Konjugats in Baf_gp130_hIL-6R-Zellen	105
5.4.2.3	Streptavidin-Konjugation mit dem DNA-Aptamer Dimer2Side	109
5.4.2.4	AIR-3A-Streptavidin-Konjugation mit siRNA gegen PLK1	111
5.4.2.5	Transfektion von U937-Zellen mit PLK1-siRNA und dem PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat	112
5.4.2.6	Internalisierung des Aptamer-Streptavidin-PLK1-siRNA-Konjugats in U937-Zellen	114
5.4.2.7	Blockade des IL-6-Signalings durch Aptamer-Streptavidin-Konjugate	116
5.4.3	Kopplung des hIL-6R-bindenden Aptamers mit Gelonin	118
5.4.3.1	Toxizitätstest	124
5.4.4	Kopplung des hIL-6R-bindenden Aptamers AIR-3A mit fluoreszierenden Proteinen	127
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>130</b>
<b>6.1</b>	<b>Analyse der Varianten des IL-6R-bindenden DNA-Aptamers</b>	<b>130</b>
<b>6.2</b>	<b>DNA und RNA derselben Sequenz, Struktur und Funktion</b>	<b>136</b>
<b>6.3</b>	<b>Dimerisierung des DNA-Aptamers</b>	<b>138</b>
<b>6.4</b>	<b>Interaktion der Aptamere mit IL-6R-tragenden Zellen</b>	<b>140</b>
6.4.1	Bindung der Aptamere an IL-6R-tragende Zellen	140
6.4.2	Internalisierung der Aptamere durch IL-6R-tragende Zellen	143
<b>6.5</b>	<b>Verwendung des IL-6R-bindenden Aptamers zur Rezeptor-vermittelten Internalisierung</b>	<b>145</b>
6.5.1	Konjugation des IL-6R-bindenden RNA-Aptamers mit Toxinen und fluoreszierenden Proteinen	145
6.5.2	Konjugation des IL-6R-bindenden Aptamers mit siRNAs	149
<b>6.6</b>	<b>Einfluss der Aptamere auf das IL-6-Signaling</b>	<b>151</b>
<b>6.7</b>	<b>Spezifität der IL-6R-bindenden Aptamere</b>	<b>153</b>
<b>7.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>155</b>
<b>7.1</b>	<b>Das IL-6R-bindende DNA- bzw. HIV-Integrase-Aptamer und der c-Myc-Promoter</b>	<b>155</b>
<b>7.2</b>	<b>Die IL-6R-bindenden Aptamere als zellspezifische Wirkstoffüberträger</b>	<b>157</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>159</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>167</b>

<b>9.1</b>	<b>GHS-Verordnung</b>	<b>167</b>
<b>9.2</b>	<b>Sicherheitshinweise für Gefahrstoffe</b>	<b>168</b>
<b>9.3</b>	<b>Gefahrstoffinformationen</b>	<b>170</b>
<b>9.4</b>	<b>Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I &amp; II</b>	<b>172</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>173</b>
<b>12.</b>	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>174</b>
<b>13.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>175</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	bovines Serum-Albumin
CBM	<i>Cytikine binding modul</i>
CD	Zirkulardichroismus
Ci	Curie
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
DMF	<i>N, N'</i> -Dimethylformamid
DSS	Disuccinimidyl Suberat
DTT	Dithiothreitol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälber-Serum
gp130	Glykoprotein 130
GMP	Guanosinmonophosphat
hIL-6	humanes Interleukin-6
HIL-6	Hyper-IL-6
hIL-6R	humaner Interleukin-6-Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
MPGN	membranproliferative Glomerulonephritis
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OSM	Oncostatin M
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PMA = TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNK	Polynucleotidkinase
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

RU	Resonanz-Einheit ( <i>resonance unit</i> )
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
SELEX	Systematische Evolution von Liganden über exponentielle Anreicherung
sgp130	lösliches gp130
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SPDP	<i>N</i> -Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPR	Oberflächenplasmonresonanz, <i>surface-plasmon-resonance</i>
SRB2m	Sulforhodamin-bindendes Aptamer
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-[ <i>N</i> -maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat
TBA	Thrombin-bindendes Aptamer
TNF	Tumornekrosefaktor
UTR	<i>untranslated region</i>
v/v	Volumenanteil
w/v	Massenanteil

## ABSTRACT

The human IL-6-receptor (IL-6R) is stimulated by the cytokine IL-6. It is involved in inflammatory reactions as well as in regulation of endocrinal or metabolic mechanisms. Dysregulation of the multifunctional cytokine IL-6 is associated with diverse diseases such as osteoporoses or rheumatoid arthritis for instance. Binding of the cytokine IL-6 to its receptor leads to association with the signal transducer gp130. Both, IL-6R and gp130 are subjected to recycling processes which causes a translocation into the cell. In this thesis the focus was on this mechanism named internalization. Cell-specific RNA and DNA aptamers were used offering the ability to bind to the IL-6R. Cell-specific Aptamer-mediated drug delivery was primarily targeted. The usage of fluorescing aptamers allowed to analyze the cytokine independent internalization into IL-6-producing cells by flow cytometry and fluorescence microscopy. Constructs were generated by assembling statistically three biotinylated aptamers and one fluorophore via a Streptavidin platform. The cell-specific internalization of these constructs could be demonstrated. This result affords the opportunity to replace the fluorophore by other substances like siRNAs for gene regulation by RNA interference. First attempts to use a siRNA targeting PLK1 failed. Constructing a more effective siRNA-conjugate should be obtained. On the other hand direct coupling of the RNA aptamer with the toxic protein gelonin could be achieved by crosslinking reaction with Sulfo-SMCC. But the aptamer-mediated internalization of the aptamer-gelonin-construct did not influence IL-6R cell proliferation. In this case a reversible thiol bond which leads to a separation inside the cell could be a possible solution. However, the DNA Aptamer was not able to bind on IL-6R cells due to a relatively fast dissociation from the IL-6R. Overcoming these difficulties the aptamer was dimerized generating a construct which was able to bind and internalize into IL-6R cells. This aptamer could also be used for cell-specific aptamer-mediated drug delivery.

## ZUSAMMENFASSUNG

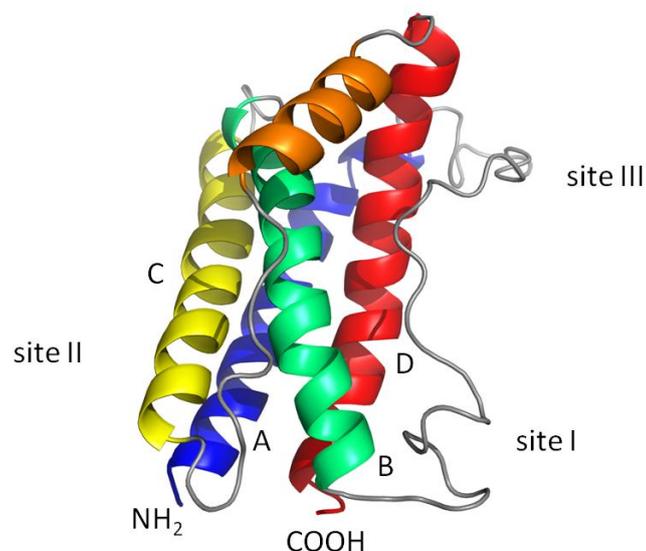
Der humane IL-6-Rezeptor (IL-6R) wird über das Zytokin IL-6 stimuliert, der nicht nur in Entzündungsreaktionen involviert ist, sondern ebenfalls in der Regulation von endokrinen und metabolischen Funktionen eine wichtige Rolle spielt. Die Dysregulation dieses multifunktionalen Zytokins wird in Zusammenhang mit diversen Erkrankungen wie Osteoporose oder rheumatoider Arthritis gebracht. Die Bindung des Zytokins IL-6 an IL-6R-tragende Zellen führt zu einer Assoziation mit dem Signalüberträger gp130. Der IL-6R und gp130 unterliegen Recyclingprozessen, in denen eine Translokation in das Zellinnere stattfindet. Dieser als Internalisierung bezeichnete Mechanismus stand im Fokus dieser Arbeit. Die Verwendung von DNA- und RNA-Aptameren, die hoch affin und spezifisch an den IL-6R binden konnten, sollten zur zellspezifischen Wirkstoffübertragung eingesetzt werden. Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Aptameren ermöglichte die Zytokin-unabhängige Internalisierung in IL-6R-tragende Zellen durchflusszytometrisch zu untersuchen, als auch mikroskopisch zu verifizieren und zu visualisieren. Ein Konstrukt, das mittels der Konjugation von Streptavidin-Biotin-Derivaten hergestellt wurde, setzte sich aus dem IL-6R-bindenden Aptamer und Fluorophor zusammen. Die zellspezifische Internalisierung konnte ebenfalls für dieses Konstrukt nachgewiesen werden. Dies eröffnete die Möglichkeit, der Fluorophor durch alternative Substanzen wie siRNAs auszutauschen, um über den RNA-Interferenz-Mechanismus gezielt Gene zu regulieren. Erste Versuche bei der Verwendung einer siRNA gegen PLK1 scheiterten. Eine Optimierung der Konstruktion der siRNA sollte hier angestrebt werden. Andererseits wurde die direkte Kopplung der IL-6R-bindenden RNA-Aptamere mit Proteinen angestrebt. Die kovalente Bindung des RNA-Aptamers mit dem Toxin Gelonin konnte mit dem Crosslinker Sulfo-SMCC umgesetzt werden. In einer Aptamer-vermittelten Internalisierung beeinflusste das Aptamer-Toxin-Konjugat nicht die Proliferation IL-6R-tragender Zellen. Hierbei könnte eine reversible Thiolbindung, die zur Toxinabspaltung im Inneren der Zelle führen würde, den Schlüssel zum Erfolg darstellen. Das DNA-Aptamer hingegen konnte aufgrund einer raschen Dissoziation vom IL-6R nicht an die Zellen binden. Es gelang durch Konstruktion eines Aptamer-Dimers die Dissoziation derart zu verlangsamen, dass die spezifische IL-6R-Bindung sowie die Internalisierung nachgewiesen werden konnte. Dieses DNA-Dimer könnte ebenfalls im Fokus zur zellspezifischen Wirkstoffübertragung dienen.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 DAS ZYTOKIN INTERLEUKIN-6 UND DER INTERLEUKIN-6-REZEPTOR

Interleukin-6 ist ein Mitglied der Zytokine. Zytokine sind Glykoproteine, die von Zellen abgesondert werden, um Immunreaktionen und Entzündungen im Körper zu regulieren. Auf Zielzellen wirken Zytokine durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, wodurch die Aktivität der Zelle reguliert wird. Die größte Gruppe von Zytokinen stimuliert die Vermehrung und Differenzierung verschiedenster Zellen während einer Immunantwort.

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6, Abbildung 1) ist ebenso als B-Zell-stimulierender Faktor-2 (BSF-2) oder Interferon Beta-1 bekannt. Das Protein IL-6 besteht aus 185 Aminosäuren und weist zwei Glykosylierungsstellen auf. Synthetisiert wird IL-6 als ein 212 Aminosäuren langes *precursor*-Protein.



**Abbildung 1: Interleukin-6 Struktur.** Struktur nach PDB 1IL6 und [1, 2]. Das amino- und carboxyterminale Ende sowie die charakteristischen vier  $\alpha$ -Helices A-D sind gezeigt. IL-6 bindet den IL-6R über *site I* und gp130 über *site II* und *III*.

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, das von vielen verschiedenen Zelltypen synthetisiert wird, hauptsächlich von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch von Makrophagen, T-Zellen, B-Lymphozyten, Granulozyten, Eosinophile, Chondrozyten, Osteoblasten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten. Physiologische Stimuli von IL-6 sind IL-1, bakterielle Endotoxine, der Tumornekrosefaktor (TNF),

*Platelet-derived growth factor* (PDGF) und Onkostatin [3]. Abhängig vom Zelltyp kann IL-6 selbst stimulierend oder inhibierend auf die eigene Sekretion wirken.

IL-6 ist nicht nur in Entzündungsreaktionen involviert, sondern ebenfalls in die Regulation von endokrinen und metabolischen Funktionen. Die multifunktionalen Eigenschaften des IL-6 sind folgend zusammen gefasst (nach [3, 4]):

a) hämatologisch

- Stimulation hämatopoetischer Stammzellen zur Bildung von diversen Zelltypen

b) immunologisch

- Induktion der Differenzierung von Makrophagen
- Induktion des Zellwachstums und zytotoxische T-Zell-Differenzierung in T-Zellen
- Induktion der Differenzierung von B-Zellen (Sekretion von Immunoglobulinen)
- Induktion des Wachstums von verschiedenen B-Zellen (Myelom- oder Hybridoma-Zellen) und B-lymphoblastoide Zellen, die mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert sind.

c) hepatisch

- Stimulation von Leberzellen
- Regulation der Akute-Phase-Reaktion

d) neurologisch

- Differenzierung von Nervenzellen

e) kardial

- Myokardiale Hypertrophie

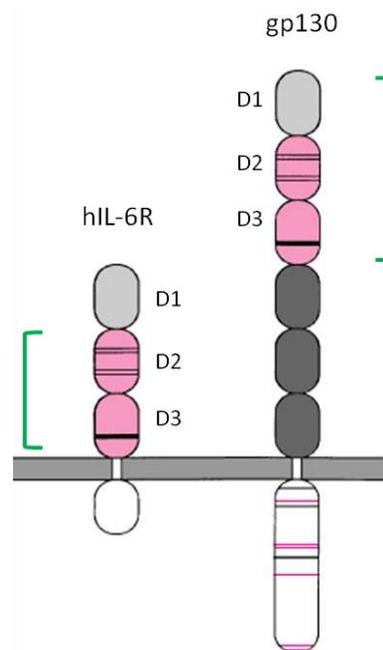
f) endokrin

- Stimulation der Wachstumshormonsekretion
- Suppression der Schilddrüse (*thyroid axis*)
- Induktion der Thermogenese

IL-6 bindet an den IL-6-Rezeptor, der sich auf Zelloberflächen hämatopoetischer Zellen (T-Zellen, Mitogen-aktivierten B-Zellen, Monozyten, einigen Makrophagen und B-Zellen abstammenden Tumorzellen), Epithelzellen (Leberzellen), Fibroblasten oder Nervenzellen befindet. In ruhenden B-Zellen hingegen werden die IL-6-Rezeptoren nicht gebildet.

Der IL-6-Rezeptor ist ein hoch glykosyliertes Protein mit einer Größe von 80 kDa (449 AS). Die intrazelluläre Domäne des IL-6-Rezeptors besitzt eine Länge von 82 AS und

weist keine Homologien zu anderen Proteinen ähnlicher Funktion auf. Rezeptoren, die am IL-6-Typ-Zytokin-Signaling beteiligt sind, werden als Zytokinrezeptor-Klasse-I-Familie bezeichnet (extrazellulärer N-Terminus und eine Transmembrandomäne, siehe Abbildung 2). Die Rezeptorfamilie ist durch ein Zytokinbindemodul (CBM) gekennzeichnet, welches aus zwei Fibronektin-Typ-II-ähnlichen Domänen besteht (rosa). Der N-terminale Teil dieser Domäne wiederum enthält ein Set aus vier konservierten Cysteinresten (dünne schwarze Linien) und die C-terminale Domäne ein Trp-Ser-X-Trp-Ser Motiv (dicke schwarze Linien). Alle Rezeptoren dieser Familie enthalten am N-Terminus eine IgG-ähnliche Domäne (hell grau). Im Falle von OSMR und LIFR liegt diese jedoch zwischen zwei CBMs. Das signalübertragende gp130 weist drei zusätzliche Membran nahe Fibronektin-Typ-III-ähnliche Domänen auf (dunkel grau). Außerdem weist gp130 im Vergleich zu den Zytokin-bindenden Rezeptoren einen längeren zytoplasmatischen Teil auf, wodurch eine Signalweiterleitung ermöglicht wird.

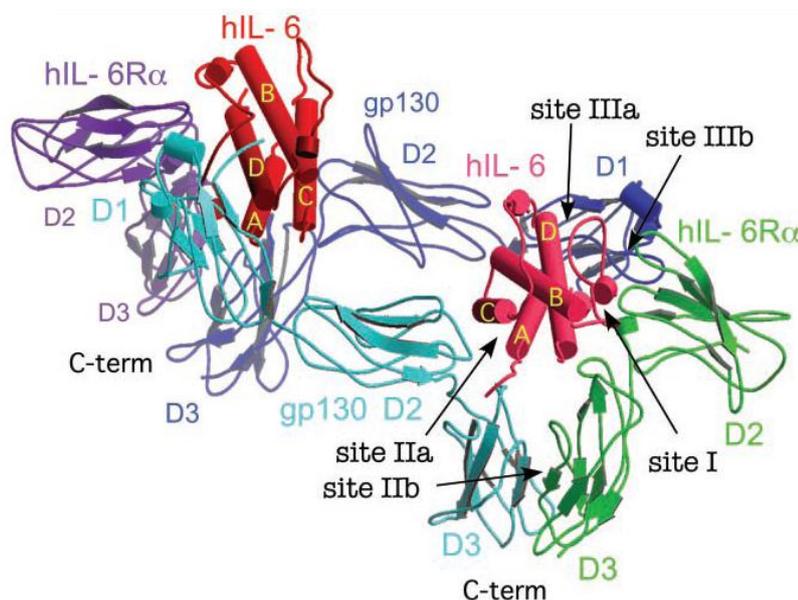


**Abbildung 2: Domänenzusammensetzung von IL-6-Typ-Zytokin-involvierten Rezeptoren [5].** Dargestellt sind die Domänen D1-D3, zytoplasmatische Domänen (weiß), CBMs (rosa), innerhalb einer CBM konservierte Cysteinreste (dünne schwarze Linien) und WSXWS-Motiv (dicke schwarze Linien), IgG-ähnliche Domäne (hell grau), Fibronektin-Typ-III-ähnliche Domäne in gp130 (dunkel grau) und mit IL-6 interagierende Domänen (grün).

Durch die Bindung von IL-6 assoziiert der IL-6-Rezeptor mit dem Signalüberträger gp130 und führt zu einer Disulfid-verknüpften Homodimerisierung von gp130. Dabei wird der IL-6-Rezeptor als  $\alpha$ -Untereinheit und gp130 als  $\beta$ -Untereinheit bezeichnet.

In der strukturellen Darstellung von IL-6 in Abbildung 1 sind die interagierenden Bereiche (*sites I-III*) dargestellt. IL-6 bindet gp130 über *site II* und *site III*. Der IL-6-Rezeptor hingegen wird über *site I* des IL-6 gebunden. Dabei sind die ersten drei Domänen von gp130 an der Bindung beteiligt (beide CBMs und die IgG-Domäne). Die Deletion der IgG-ähnlichen Domäne von gp130 führt zu einer wesentlichen Schwächung dieser Interaktion [6]. In gp130 wurden darüber hinaus zwei Aminosäurereste des CBMs identifiziert, die zur Bildung des IL-6/IL-6-Rezeptor-Komplexes essentiell sind [7]. Die beiden Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen des gp130 sind nicht in die Interaktion mit IL-6 involviert. Seitens des IL-6-Rezeptors sind die beiden CBM-Domänen zur Interaktion wichtig und die IgG-ähnliche Domäne trägt nicht zur Bindung bei [1].

Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse wurde die Struktur des Komplexes als Hexamer aufgeklärt, bestehend aus zwei Molekülen IL-6, zwei IL-6-Rezeptoren und zwei Molekülen gp130. In Abbildung 3 ist diese Struktur dargestellt.



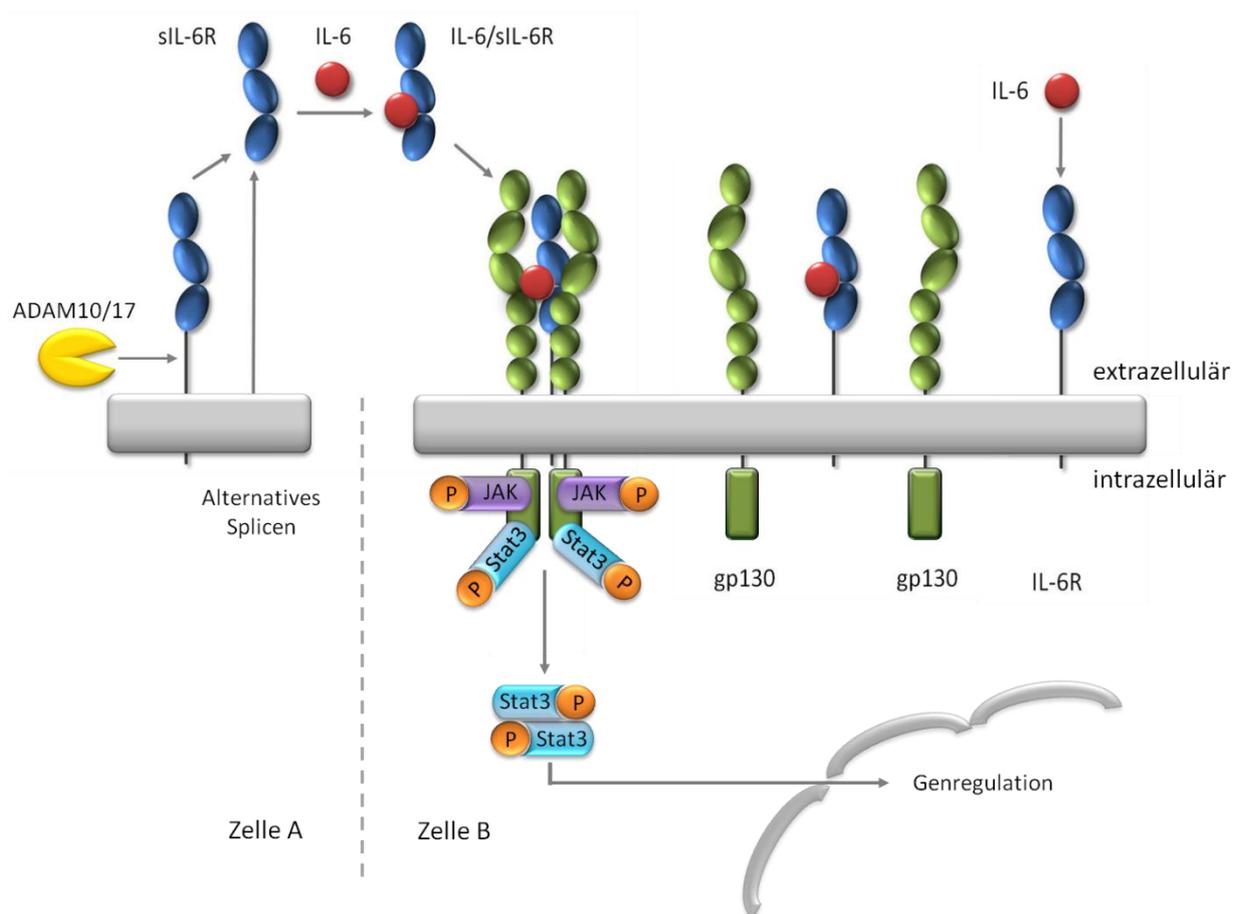
**Abbildung 3: Hexamer aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6-Rezeptor und gp130 [8].** Gezeigt sind der extrazelluläre Teil des humanen IL-6-Rezeptors (hIL-6R $\alpha$ ) mit den Domänen D2 und D3 (grün und lila), das humane Interleukin-6 (hIL-6, rot und rosa) und gp130 mit den Domänen D2 und D3 (hell und dunkel blau). Die fünf Interaktionsbereiche wurden als *site I*, *IIa*, *IIb*, *IIIa* und *IIIb* gekennzeichnet.

Grötzinger et al. postulieren hingegen eine tetramere Struktur, bestehend aus einem Molekül IL-6, einem IL-6-Rezeptor und zwei Molekülen gp130 [9]. Beobachtet wurde, dass hohe IL-6-Konzentrationen zu einer Abnahme der biologischen Antwort führen. Nur bei niedrigen IL-6-Konzentrationen kommt es zur Bildung eines aktiven tetrameren Komplexes. Steigende IL-6-Konzentrationen fördern zunehmend die Bildung des

Hexamers, was inaktivierend und somit inhibierend auf die Zellstimulation wirkt. Zur Aufklärung der in Abbildung 3 gezeigten Struktur wurden Proteinkonzentrationen im mikromolaren Bereich verwendet, wodurch die Bildung des Hexamers bedingt wäre. D. h. der Komplex aus IL-6, IL-6R und gp130 kommt konzentrationsabhängig sowohl als Tetra- als auch als Hexamer vor.

### 1.1.1 DIE KLASSISCHE IL-6-VERMITTELTE SIGNALÜBERTRAGUNG

IL-6 bindet bei Stimulation von Zielzellen an den IL-6-Rezeptor und der Komplex assoziiert folgend mit gp130. Im ersten Schritt der ausgelösten Signalkaskade wird eine Tyrosinkinase aktiviert. Dieses als Janus-Kinase (JAK) bezeichnete Enzym ist an den zyttoplasmatischen Regionen von signalübertragenden Zytokinrezeptoren prä-assoziiert (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Interleukin-6-Signaling.** Das Zytokin IL-6 bindet an den zellständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R, rechts) und führt zu einer Assoziation mit gp130-Molekülen. Es folgt eine Signalübertragung ins Zellinnere (mitte), wodurch im Zytosol JAK und Stat3 phosphoryliert werden. pStat3 dimerisiert und wandert zur Genregulation in den Zellkern. Über alternatives *Splicing* oder Ektodomänen-*Shedding* entsteht eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors (sIL-6R) und kann nach IL-6-Bindung IL-6R-lose Zellen über gp130 stimulieren (*trans-Signaling*, links).

In Mammalia gibt es vier JAKs: JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2. Am N-Terminus weisen sie eine *Four-point-one/Ezrin/Radixin/Moesin* (FERM-Domäne) auf, zentral eine JAK-homologe 2-Pseudokinase-Domäne und am C-Terminus eine JAK-homologe 1-Kinase-Domäne. FERM scheint für die Interaktion von JAK und dem Zytokinrezeptor eine wichtige Rolle zu spielen. Der Pseudokinase wird eine essentielle regulatorische Rolle zugeschrieben. Außerdem sind JAKs auto-aktiv und transphosphorylieren sich selbst. Die phosphorylierte JAK trägt dazu bei, dass SH2-Domänen-tragende Signalproteine an den signalübertragenden Rezeptor binden können. Ein solches Protein ist STAT. „STAT“ steht für „Signalüberträger und Aktivator der Transkription“. In Mammalia wurden sieben verschiedene STAT-Proteine identifiziert: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. STAT besteht aus fünf essenziellen Domänen: Eine vier Helix-transaktivierenden Domäne, einer zentralen, DNA-bindenden Ig-ähnlichen Domäne, einer helikalen Linkerdomäne, einer SH2-Domäne und einer Effektor-domäne.

Nach Bindung von STAT an den Signal-übertragenden Rezeptor wird STAT phosphoryliert (pSTAT) und dimerisiert. Nach anschließender Translokation in den Nukleus binden die pSTAT-Dimere an spezifische DNA-Abschnitte innerhalb bestimmter Promoterregionen der Zielgene. Eines dieser Gene ist das *socs*-Gen. „Socs“ steht für „*suppressor of cytokin-signaling*“ und die entsprechenden Gene codieren Proteine, die zur Unterdrückung des *Signalings* führen und somit eine negative Rückkopplung darstellen. Socs können direkt JAK inhibieren, indem sie an den Rezeptor oder an JAK selbst binden. Außerdem sind Socs in der Lage, den Rezeptorkomplex zu binden und Signalproteine zu assoziieren, die zu einer proteasomalen Degradation über die Socs-Box führen. Diese interagieren mit Elongin B und C und rekrutieren den E3-Ubiquitin-Ligasekomplex [5, 10].

Rezeptoren unterliegen Recyclingprozessen, in denen sie über Endozytose ins Innere der Zelle transportiert werden. Die sogenannte Internalisierung von Rezeptoren findet bei einer Temperatur von 37 °C statt [11]. Im Falle des IL-6R wird dieser zusammen mit gebundenem IL-6 in die Zelle transportiert. Diese Internalisierung des IL-6R ist von gp130 abhängig. Es wurde eine 10-AS-lange Sequenz identifiziert, die für eine Internalisierung von Bedeutung ist. Es handelt sich um die Aminosäuren 142 bis 151 mit der Sequenz TQPLLDSEER, die sich am zytosolischen Ende von gp130 befindet [12]. Gleichzeitig führt die IL-6 Bindung zur Herabregulierung des IL-6-Rezeptors [11].

### 1.1.2 TRANS-SIGNALING

Neben dem oben beschriebenen klassischen IL-6-Signalweg gibt es noch einen weiteren Signalweg, wodurch Zellen, die nicht den IL-6-Rezeptor tragen, von IL-6 stimuliert werden können. Dieser Mechanismus wird *trans-Signaling* genannt. Ermöglicht wird das *trans-Signaling* durch eine von der Zelle losgelöste Form des IL-6-Rezeptors (siehe Abbildung 4). Die lösliche Form des IL-6-Rezeptors (sIL-6R) ist in gesunden Menschen im Blut und im Urin zu finden. Erhöhte sIL-6R-Konzentrationen konnten im Zusammenhang mit einigen Krankheiten beobachtet werden [13]. Gebildet wird die lösliche Form des IL-6-Rezeptors über zwei Wege: alternatives *Splicing* oder Proteolyse des IL-6-Rezeptors, auch „*Shedding*“ genannt.

Alternatives *Splicing* bezeichnet einen Vorgang, bei dem aus einer codierenden DNA-Sequenz mehrere Proteine hervorgebracht werden können. Im Falle des IL-6-Rezeptors resultieren einerseits membranständige Rezeptoren mit einer Transmembrandomäne, andererseits resultieren lösliche Rezeptoren ohne Transmembrandomäne, die zur Form des sIL-6R führen [14]. Die zweite Möglichkeit zur Bildung des sIL-6R besteht in der proteolytischen Spaltung von der Membranoberfläche. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), stimulieren Zellen zum *Shedding* des IL-6-Rezeptors. Die PMA-Stimulation hängt mit der Aktivierung von Proteinkinase C zusammen, da beobachtet wurde, dass eine Inhibierung von Proteinkinase C ebenfalls zu einer Inhibierung des IL-6-Rezeptor *Shedding* führt [15, 16]. Nach PMA-Stimulation wird der IL-6-Rezeptor zwischen Gln<sup>357</sup> und Asp<sup>358</sup> von der Zelloberfläche gelöst [17].

Verantwortlich für die proteolytische Abspaltung des IL-6-Rezeptors von Membranoberflächen sind *Sheddasen*. Im Falle des IL-6-Rezeptors handelt es sich um Enzyme der Disintegrin- und Metalloproteasen- (ADAM, *a disintegrin and metalloproteinase domain*) Familie, wie ADAM10 und ADAM17 [18]. ADAM17 ist ebenfalls unter den Namen TACE (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  konvertierendes Enzym) bekannt und ist nach einer PMA-Stimulation hauptsächlich für das *Shedding* des IL-6-Rezeptors verantwortlich. Der C-Terminus des IL-6-Rezeptors, der nach dem *Shedding* verbleibt, wird von der  $\gamma$ -Sekretase proteolytisch abgespalten und abgebaut. ADAM10 hingegen *shedded* den IL-6R in einem langsamen konstitutiven Prozess [19].

Bakterielle Toxine können ebenfalls ein *Shedding* des IL-6-Rezeptors auslösen. Die Abspaltung des Rezeptors liegt jedoch zehn Aminosäuren entfernt zur PMA stimulierten

Spaltstelle [20]. Eine bakterielle Metalloprotease trennt den IL-6-Rezeptor wiederum an einer anderen Stelle von der Zelloberfläche ab [21]. Alle drei Spaltprodukte des IL-6-Rezeptors die enzymatisch über ADAM17/10, bakterielle Toxine oder Metalloproteasen entstehen, weisen unabhängig von der Spaltstelle biologische Aktivität auf.

Das *trans-Signaling* über sIL-6/IL-6 untersteht Regulationsprozessen. Denn neben der löslichen Form des IL-6R gibt es ebenfalls die lösliche Form von gp130 (sgp130). In menschlichen Seren beträgt die Konzentration 100 bis 300 ng/mL. sgp130 besitzt keinen Einfluss auf das *cis-Signaling*, jedoch auf das *trans-Signaling*, da sIL-6 an gp130 und sgp130 binden kann. Somit kann sgp130 zur kompetitiven Inhibierung der sIL-6/IL-6-Stimulation führen [1].

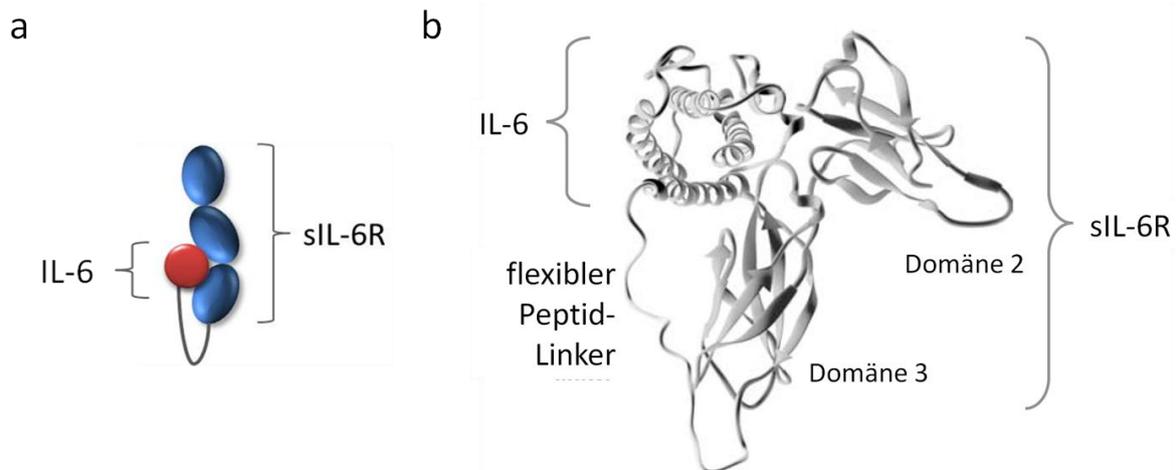
### **1.1.3 DIE ROLLE DES IL-6 BEI KRANKHEITEN**

Eine Hoch- oder Herabregulierung der IL-6- bzw. sIL-6R-Level (Pfeil nach oben = hoch reguliert; Pfeil nach unten = herab reguliert) wurde im Zusammenhang mit vielen Krankheiten beschrieben [22]. Im Folgenden sind einige davon beispielhaft gezeigt:

- a) Entzündungskrankheiten
  - ↑ Osteoporose (Knochenschwund) [23]
  - ↑ Rheumatische-Athritis [24]
  - ↓ Sepsis [13]
  - ↑ Membranoproliferative-Glomerulonephritis (MPGN, Erkrankung des Nierenkörperchens) [25]
  - ↑ Morbus-Castleman (vergrößerte Lymphknoten) [26]
  - ↑ Multiples Myelom (Plasmozytom) [27]
- b) Neurologisch begründete Krankheiten
  - ↓ Depression [28]
- c) Krebs
  - ↓ Brustkrebs [29]
- d) Pathogene Infektionen
  - ↑ AIDS [30]
  - ↓ Kachexie (krankhafte starke Abmagerung) [31]

### 1.1.4 DAS DESIGNER-ZYTOKIN HYPER-IL-6

Zur Optimierung der Ausbildung des aktiven IL-6/IL-6-Rezeptor-Komplexes und somit der IL-6 vermittelten Signalübertragung entstand die Idee, IL-6 und den IL-6-Rezeptor kovalent miteinander zu verknüpfen. Diese Verbindung musste sowohl die Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6-Rezeptor, als auch die Bindung zu zwei gp130-Molekülen gewährleisten. [32].



**Abbildung 5: Hyper-IL-6.** Fusion vom N-Terminus des IL-6 und C-Terminus des sIL-6R über einen Glycin/Serinreichen Linker (18 Aminosäuren). Schematische Darstellung (a) und Molekularmodell (b), in dem vom sIL-6R nur Domänen II und III dargestellt sind [1, 32].

Die Lösung lag in der Verbindung des carboxyterminalen Endes des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6R) mit dem aminoterminalen Ende des IL-6. Der Abstand zwischen den beiden Komponenten wurde mit 40 Å bestimmt und entsprach etwa 15 bis 20 Aminosäuren. Somit wurde zwischen die cDNA des IL-6 und des sIL-6R eine Glycin-Serin codierende Sequenz als Linker eingesetzt (Abbildung 5). Das resultierende Hyper-IL-6 ist 100- bis 1000-mal effektiver als die Einzelmoleküle im Komplex [32, 33].

## 1.2 APTAMERE

1990 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen zugleich eine neue Methode zur Selektion kleiner Nucleinsäuren, die selektive Bindungseigenschaften für definierte Zielmoleküle aufwiesen [1, 2]. Sie gaben dieser *in-vitro*-evolutiven Methode den Namen SELEX („Systematische Evolution von Liganden über exponentielle Anreicherung“, „*systematic enrichment of ligands by exponential enrichment*“ [2]). Den Startpunkt eines solchen Selektionsprozesses bildet ein Pool von  $10^{15}$  verschiedenen Nucleinsäuren. Ziel ist es, Nucleinsäuren zu finden, die aufgrund ihrer definierten dreidimensionalen Faltung ein gewähltes Zielmolekül mit hoher Affinität und Spezifität binden können. Ein typisches SELEX-Experiment umfasst mehrere Runden bestehend aus jeweils drei Schritten: der Bindung an das Target, der Isolation der am Zielmolekül gebundenen Oligonucleotide und der Vervielfältigung dieser Moleküle. In fünf bis 15 Runden dieser Methode lassen sich spezifische und hoch affine Aptamere für eine große Vielzahl an Zielmolekülen generieren [34]. In den vergangenen 20 Jahren wurden zahlreiche Aptamere für kleine Moleküle, wie Farbstoffe [35] oder Metallionen, Biomakromoleküle wie Proteine [36], Viren [37], Zellen [38] oder gar ganze Organismen wie Trypanosomen [39] selektiert.

Die hohe Spezifität von Aptameren für ihre Zielmoleküle sowie die hohen Bindungsaffinitäten machen Aptamere zu vielseitig einsetzbaren Werkzeugen.

Aptamere können zudem inhibierend auf Enzyme wirken, indem sie am aktiven Zentrum binden. Die chemische Information, die in der Struktur des Aptamers „gespeichert“ ist, kann auf eine niedermolekulare Substanz übertragen werden. Diese niedermolekulare Substanz kann anschließend an Stelle des Aptamers an das aktive Zentrum binden und wiederum inaktivierend wirken. Zur Identifizierung einer passenden Substanz werden sogenannte Aptazyme verwendet, bestehend aus einem Aptamer in Fusion mit einem Hammerhead-Ribozym. Die Bindung des Aptamers an das Zielmolekül bewirkt eine Konformationsänderung des Ribozyms, so dass die inaktive Form des Ribozyms entsteht. Ist jedoch eine andere Substanz anwesend und in der Lage, an derselben Bindungsstelle am Zielmolekül zu binden, bindet das Aptamer nicht und das Ribozym ist aktiv. Die Identifikation neuer niedermolekularer Proteininhibitoren wird über *High-Throughput*-Verfahren durchgeführt, in denen Poole gescreent werden [40].

Eine weitere Möglichkeit zur Anwendung von Aptameren liegt in der Identifizierung von Zelloberflächenproteinen. Aptamere können gezielt zur Detektion von Veränderungen an Zelloberflächen eingesetzt werden, die im Zusammenhang mit einem pathogenen Zustand der Zelle stehen. Handelt es sich bei dem Zielmolekül um einen Rezeptor, eröffnen sich weitere Möglichkeiten der Aptameranwendung. Rezeptorspezifische Aptamere lassen sich im Prozess der Rezeptor-Internalisierung mit in das Innere der Zellen transportieren. Die Verwendung von modifizierten Aptameren lassen diese als Transportvehikel fungieren, die zellspezifisch einsetzbar sind.

### **1.2.1 APTAMER-VERMITTELTE WIRKSTOFFÜBERTRAGUNG IN ZELLEN**

Ein neues Anwendungsgebiet von zellspezifischen Aptameren (wie z. B. Rezeptorbindende Aptamere) besteht darin, diese als Carrier zu verwenden. Durch die Kopplung eines zellspezifischen Aptamers mit Wirkstoffen könnte die Verfügbarkeit von Therapeutika an den Zielzellen oder Geweben erheblich gesteigert werden. Eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung ins Innere der Zielzelle würde zudem zu einer selektiven Steigerung der Effektivität des Wirkstoffes führen. Die endosomale Aufnahme und die anschließende Entlassung aus dem Endosom ins Zytoplasma stellen die zwei limitierenden Faktoren der Internalisierung dar. Diversen Arbeitsgruppen war es möglich, zellspezifische Aptamere als Vehikel zu verwenden, um verschiedene Moleküle ins Zellinnere einzuschleusen. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung über bisherige Publikationen, in denen eine Aptamer vermittelte Internalisierung erfolgreich durchgeführt wurde.

In Abbildung 6 sind verschiedene Möglichkeiten zusammengefasst, über die Aptamere mit Wirkstoffen verknüpft wurden und welche Wirkstoffe bereits verwendet wurden, um diese zielgerichtet in Zellen einzuschleusen.

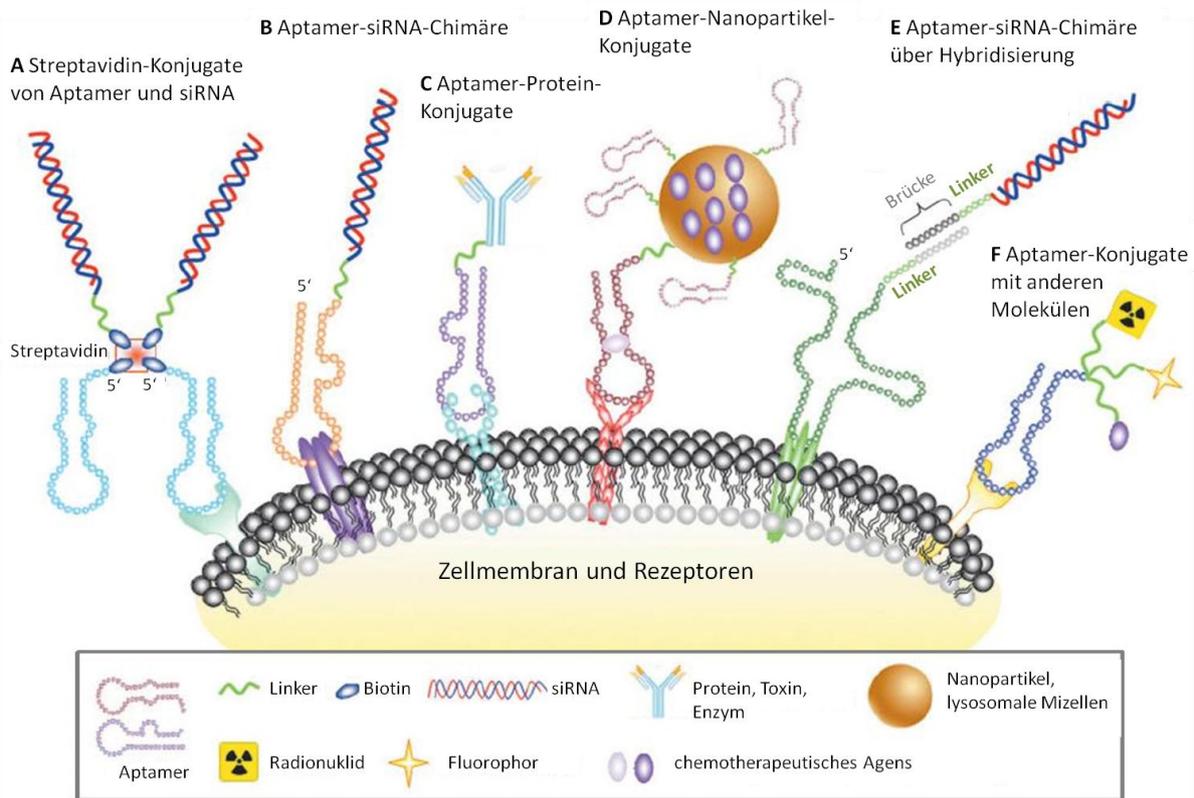
Eine besonders vielversprechende Anwendungsmöglichkeit bilden die sogenannten siRNAs (*small interfering RNAs*), kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die zum Abbau von mRNAs führen. Dieses Phänomen wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Es stellt die gezielte Genregulation in der Zelle dar. Entdeckt wurde der Mechanismus der RNAi 1998 von Fire und Mello [41]. RNAi wird durch eingeschleuste doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst.

**Tabelle 1: Zellspezifische Aptamer-Konjugate.** Übersicht über bereits veröffentlichten internalisierte Aptamer-Konjugate.

Konjugate	Internalisierte Substanz und Literatur	Zelllinie
siRNA [42]	PMSA-Aptamer/PLK1-siRNA [43, 44]	LNCaP, PC3
	PMSA-Aptamer-Bcl2[44]	LNCaP, PC3
	CD4-Aptamer/(( $\phi$ 29pRNA) <sub>2</sub> /GFP-siRNA [45]	Drosophila S2
	CD4-Aptamer/(( $\phi$ 29pRNA) <sub>2</sub> /Luziferase-siRNA [45]	Mausfibroblasten A317-PAR
	PSMA-Aptamer/Streptavidin/anti-Lamin-A/C-siRNA [46]	LNCaP, PC3
Ribozym	PSMA-Aptamer/Streptavidin/ GAPDH-siRNA [46]	LNCaP, PC3
	CD4-Aptamer/(( $\phi$ 29pRNA) <sub>2</sub> /Survivin-Ribozym [45]	MDA-231, PC3, A-549, T47D, MCF-7
Toxine	PSMA-Aptamer/Gelonin [47]	LNCaP, PC3
Chemotherapeutika	PSMA-Aptamer/Doxorubicin (interkaliert) [48]	LNCaP, PC3
	sgc8c-Aptamer-Doxorubicin (kovalent) [48, 49]	CCRF-CEM
anti-Krebsmedikamente in Polymeren	PSMA-Aptamer/Nanopartikel/Docetaxel [50, 51]	LNCaP, PC3
Liposom-Nanopartikel	Nucleolin-Aptamer/Liposom/Calcein [52]	MCF-7, LNCaP
	Nucleolin-Aptamer/Liposom/Cisplatin [33]	MCF-7, LNCaP
virale Capside	sgc8c-Aptamer /MS2-Capsid/Fluorophor [53]	Jurkat
Radionucleotide	Ecort-Aptamer/Technetium ( <sup>99m</sup> Tc) [54]	Blut
Enzyme	Maus-Transferrinrezeptor-Aptamer/Streptavidin/ Dephospho- $\alpha$ -L-Iduronidase [55]	Mausfibroblasten

Im Zytosol wird diese dsRNA vom Enzym Dicer in 21 bis 26 Nucleotid-lange RNA-Stücke gespalten. Diese siRNAs werden von RISC (*RNA induced silencing complex*) gebunden. Dem Leitstrang folgend hybridisiert der gesamte Komplex an die komplementäre mRNA der Zelle und baut diese ab.

Mit Hilfe von Aptameren können siRNAs in die Zelle eingeschleust werden. Dazu ist es notwendig, das Aptamer mit dsRNA zu verknüpfen. Drei verschiedene Methoden wurden bislang verwendet. Zum einen wurde das Aptamer über einen Linker am



**Abbildung 6: Aptamer vermittelte zellspezifische Wirkstoffübertragung [56].** Auf Zelloberflächen präsentierte spezifische Rezeptoren können über Aptamere angesteuert werden. Durch Kopplung der Aptamere mit Wirkstoffen oder anderen Molekülen lassen sich die Aptamere idealerweise als Vehikel verwenden. **A** Streptavidin-Konjugate von Aptamer und siRNA. **B** Aptamer-siRNA-Chimäre. **C** Aptamer-Protein Konjugate. **D** Aptamer-Nanopartikel Konjugate. **E** Aptamer-siRNA-Chimäre über Hybridisierung. **F** Aptamer-Konjugate mit anderen Molekülen.

3'-Ende verlängert, der dann in einen Strang der RNA übergang [44]. An die RNA wurde anschließend der komplementäre Strang hybridisiert (Abbildung 6B). In einem ähnlichen Ansatz wurde die RNA über einen Linker an das Aptamer hybridisiert (Abbildung 6E). Dies hat den Vorteil, dass DNA-Aptamere ebenfalls problemlos mit dsRNA gekoppelt werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Streptavidin-Konjugation. Voraussetzung dafür ist, dass sowohl das Aptamer als auch die dsRNA biotinyliert vorliegen [42, 46].

Eine kovalente Kopplung des Aptamers mit Proteinen oder anderen chemischen Substanzen kann über den Einsatz von Crosslinkern erfolgen [47]. Das Crosslinking eines Aptamers mit einer Proteinkomponente setzt jedoch deren Funktionalisierung voraus. Es gibt homo- oder heterobifunktionale Crosslinker, die Kohlenhydrate oder funktionelle Gruppen wie primäre Amine, Thiole oder Carboxyle zu verbinden vermögen. Ein Nachteil von homofunktionalen Crosslinkern liegt an der ungerichteten Reaktion, wobei gleiche Substanzen miteinander verbunden werden. Ein Vorteil hetero-

bifunktionaler Crosslinker ist, dass die Bindungsreaktion in zwei aufeinander folgenden und getrennten Schritten erfolgen kann und somit eine gerichtete Reaktion stattfindet. Darüber hinaus sind einige der Bindungen unter bestimmten Bedingungen reversibel. Nachteilig sind allgemein geringe Ausbeuten und eine hohe Hydrolyse-Empfindlichkeit.

### **1.2.2 INTERLEUKIN-6-REZEPTOR-BINDEnde APTAMERE**

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hahn wurden sowohl DNA- als auch RNA-Aptamere mit Spezifität für den löslichen IL-6-Rezeptor selektiert und charakterisiert [57, 58].

#### **1.2.2.1 Das IL-6R-bindende RNA-Aptamer**

Das RNA-Aptamer AIR-3A mit Spezifität für den löslichen IL-6R wurde von Frau Dr. Meyer selektiert und charakterisiert [57]. Dieses hoch spezifische RNA-Aptamer wies eine Dissoziationskonstante im unteren nanomolaren Bereich ( $K_d = 20$  nM) auf. Eine auf das Konsensusmotiv verkürzte 19 Nucleotid-lange Variante zeigte immer noch vergleichbare Eigenschaften bezüglich Affinität und Spezifität und wurde als AIR-3A bezeichnet. Kompetitionsstudien zeigten, dass AIR-3A keinen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen dem IL-6R und IL-6 bzw. gp130 hatte.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte RNA-Aptamere in der Lage waren, Zellen zu binden, die den nativen IL-6R auf der Oberfläche präsentierten.

#### **1.2.2.2 Das IL-6R-bindende DNA-Aptamer**

DNA-Aptamere mit Spezifität für den IL-6R wurden von Frau Dr. Zivkovic selektiert und charakterisiert [59]. Die fünf identifizierten IL-6R-bindenden DNA-Aptamere wiesen Dissoziationskonstanten zwischen 200 nM und 500 nM auf. Eine auf 16 Nucleotide verkürzte Variante behielt die Fähigkeit, das Zielmolekül zu binden, bei. Diese als AID-1 bezeichnete DNA-Aptamer bestand aus der Basenabfolge d(GGGT)<sub>4</sub>, einer bisher bekannten Sequenz anderer Funktion, die strukturell gut untersucht war und eine sogenannte Quadruplex-Struktur ausbildet.

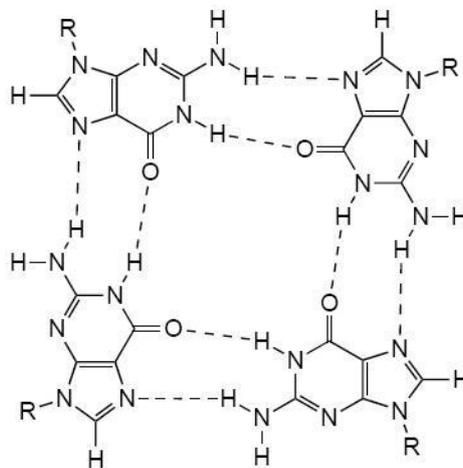
Zur Bestimmung der Spezifität des DNA-Aptamers AID-1 wurden Varianten identifiziert, die nicht mehr in der Lage waren, den IL-6R zu binden. Zudem ergaben Kompetitionsstudien, dass die Bindung des DNA-Aptamers an den IL-6R die Interaktion mit IL-6 oder gp130 nicht beeinträchtigt.

### **1.2.3 HIV-1 INTEGRASE INHIBITOREN**

Die Basenabfolge d(GGGT)<sub>4</sub> gehört zu einer Gruppe von HIV-1 Integrase Inhibitoren, die lediglich aus Guanosinen und Thyminen bestehen. Diese wirken sich sowohl inhibitorisch auf die Virusinfektion als auch auf die Aktivität der HIV-1 Integrase aus. Die Inhibition der Virusinfektion wird durch Bindung des Oligonucleotids an das HIV-Glycoprotein120 (gp120) bewirkt, wodurch eine Interaktion mit dem CD4-Rezeptor verhindert wird. Die inhibitorische Wirkung auf die HIV-1 Integrase wird erreicht, indem der Inhibitor die Virus-DNA-Bindung verhindert und es somit sowohl zu verminderter 3'-Processing-Aktivität als auch zu vermindertem Strangtransfer kommt. d(GGGT)<sub>4</sub> wird auch als T30923 bezeichnet und ist ein Derivat eines weiteren HIV-Inhibitors, der bereits in klinischen Studien erprobt wird. Dieser als Zintevir (T30177) bezeichnete Inhibitor weist die Sequenz 5'-G\*TGGTGGGTGGGTGGG\*T-3' auf, wobei zwei Phosphatbindungen durch Phosphorothioatbindungen (G\*) ersetzt sind. Diese dienen dem Schutz vor Degradation. Die unmodifizierte Variante von Zintevir T30175 sowie die Phosphorothioat-Variante von T30923, die als T30695 bezeichnet wird, wirken ebenso inhibitorisch auf die HIV-Infektion als auch auf die Integrase-Aktivität. Weitere Inhibitoren dieser Gruppe stellen intrinsische G-Quadruplexe dar [60-62].

### 1.3 G-QUADRUPLIX-STRUKTUREN

1962 beschäftigte sich die Arbeitsgruppe von David Davies mit dem Phänomen, dass konzentrierte Lösungen aus Guanosinmonophosphat (GMP) zu Gelen erhärten [63, 64]. Sie beobachteten, dass konzentriertes 5'-GMP (25 mg/mL) bei pH 5 sehr viskos ist und sich nach Abkühlung auf 0 °C ein klares Gel bildete. Im Gegensatz dazu wurde dieses Phänomen bei pH 7 oder pH 2 nicht beobachtet. Über optische Untersuchungen und Röntgendiffraktometrie wurde zum ersten Mal die Formation eines planaren Tetramers aus vier Guaninresten postuliert. Vier Guaninreste bilden dabei eine planare Struktur, in der die Basen zyklisch über Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert sind. (Abbildung 7).

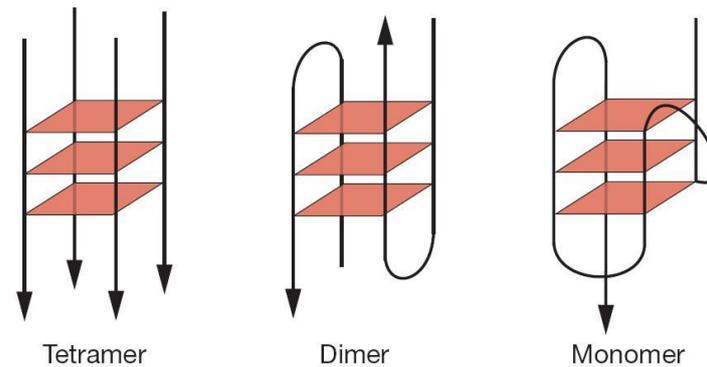


**Abbildung 7: Schematische Darstellung eines G-Quartetts [64].** Vier Guaninreste bilden eine planare Struktur, G-Quartett genannt, die über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken stabilisiert ist.

Die Übereinanderlagerung von zwei oder mehreren dieser G-Quartette führen zur Ausbildung sogenannter G-Quadruplexe. Diese G-Quadruplexe sind zwischen den einzelnen G-Quartetten über die Koordination monovalenter Kationen wie  $K^+$  und  $Na^+$  stabilisiert [65].

G-Quadruplexe können sich aus einem, zwei oder vier Strängen bilden (Abbildung 8). Aufgrund der relativen Anordnung der Stränge zueinander und der glykosidischen Konformation des Guanins in *syn* oder *anti* können G-Quadruplexe klassifiziert werden. Die vier Stränge können dieselbe Orientierung aufweisen (parallel), drei Stränge in dieselbe und ein Strang gegensätzlich orientiert sein (Hybrid) oder jeweils zwei Stränge in dieselbe Richtung weisen, wobei die Stränge diagonal zueinander oder nebeneinander in dieselbe Richtung weisen können (antiparallel). Ferner können die Loops, bestehend aus den Nucleotiden, die nicht zur Ausbildung der Quadruplex-

Struktur beitragen, klassifiziert werden. Außerdem kann die Richtung der Wasserstoffbindungen eines G-Quartetts im oder gegen den Uhrzeigersinn orientiert sein.



**Abbildung 8: Der G-Quadruplex [66].** Schematische Anordnung von G-Quadruplexen basierend auf einem Monomer, Dimer oder Tetramer.

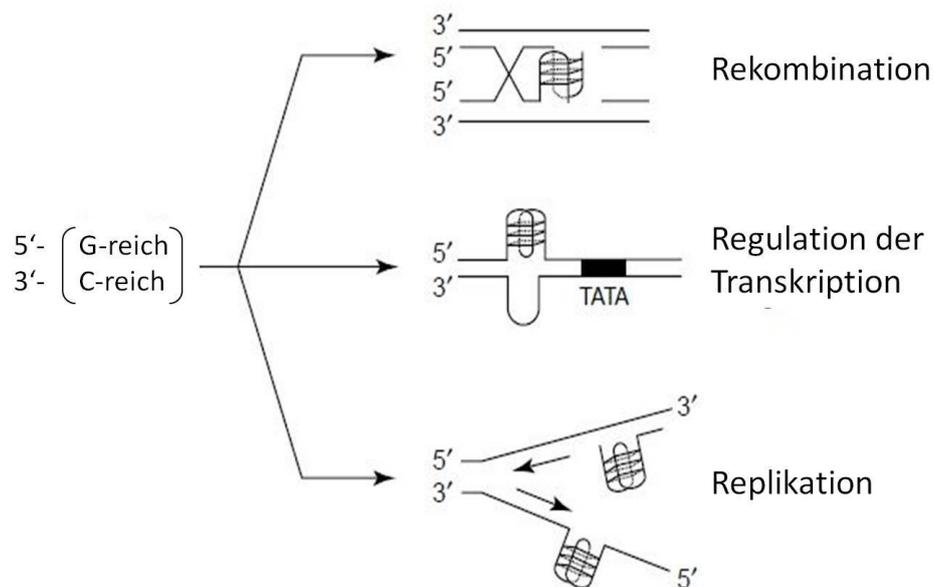
Das Interesse an Quadruplexen hat sich in den vergangenen Jahren intensiviert, da Quadruplexe in wichtigen biologischen Prozessen eine Rolle spielen und als Ziel therapeutischer Eingriffe dienen können.

### 1.3.1 NATÜRLICH VORKOMMENDE G-QUADRUPLEXE

Ein bekanntes Beispiel zum natürlichen Vorkommen von G-Quadruplexen sind die Enden der Chromosomen, die sogenannten Telomere, die zur Instandhaltung und Replikation der chromosomalen Enden dienen. Telomere bestehen aus Abschnitten von sich wiederholenden DNA-Sequenzen und deren assoziierten Proteinen. Telomer-DNA ist hauptsächlich doppelsträngig, endet jedoch am 3'-Ende mit zusätzlichen G-reichen Abschnitten. In zahlreichen Organismen stellen diese einzelsträngigen G-reichen Regionen Substrate für Telomer-Terminaltransferasen dar [67-69]. Eine Vielzahl von Organismen weisen Telomere auf, die folgende Konsensussequenz aufweisen:  $d(T/A)_{1-4}dG_{1-8}$  [70]. Die Konsensussequenz beim Menschen lautet  $d(TTAGGG)$  [71]. In  $K^+$ -haltiger Lösung bildet diese DNA eine tetramere parallel-strängigen G-Quadruplex aus, wobei drei G-Quartette gebildet werden, in denen Guanin eine *anti*-glykosidische Konformation aufweist [72]. Telomere können durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II in RNA transkribiert werden [73]. Die resultierende RNA weist ebenfalls G-Quadruplex-Strukturen auf.

Desweiteren gibt es in Ciliaten und Hefen G-Quadruplex-bindende Proteine. Das Repressor-Aktivator Protein 1 (RAP1) aus Hefe ist an der Instandhaltung von Telomeren beteiligt. RAP1 bindet nicht nur doppelsträngige DNA, sondern fördert zudem die Formation eines DNA-G-Quadruplexes. Außerdem bindet RAP1 parallele und anti-parallele DNA-Quadruplexe [74].

Überdies können Promotorregionen ebenfalls G-Quadruplexstrukturen aufweisen. Im Falle des *c-Myc*-Promoters wurde postuliert, dass die Quadruplexstruktur als *cis*-Element der Transkriptionsinitiation dienen könnte. Die Ausbildung des Quadruplexes spielt eine Rolle in der Aktivierung von *c-Myc in vivo* [75]. In Abbildung 9 ist schematisch gezeigt, wie G-Quadruplexe innerhalb verschiedener zellulärer Prozesse, wie der Rekombination, Transkription oder auch der Replikation, agieren können.



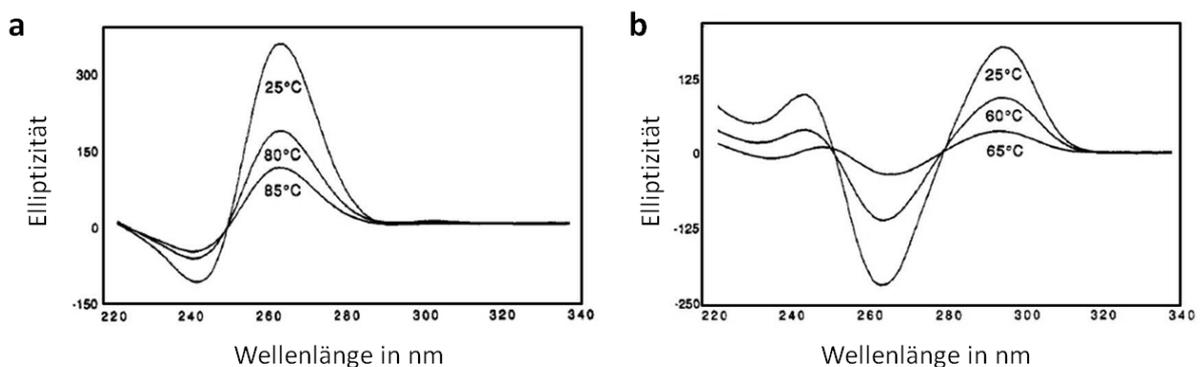
**Abbildung 9: Schematische Darstellung von G-Quadruplexen innerhalb zellulärer Prozesse.** G-reiche Sequenzen können sich in nicht-Telomer-Regionen befinden und beeinflussen Rekombination, Transkription und Replikation [64]. Eine Quadruplex-Struktur kann als *cis* Element zur Transkriptions-Inhibierung führen, zur Blockade der RNA-Polymerase oder zur Destabilisierung von Chromosomen.

Außerdem wurden vier Helikasen identifiziert, die in der Lage waren, gezielt G-Quadruplex-enthaltende DNA zu entwinden, beispielsweise die Helikase SGS1 aus Hefe, die G-Quadruplex-DNA zehn Mal effektiver entwindet als doppelsträngige DNA [76]. Diese und auch weitere Helikasen dienen womöglich zur Entfernung von Quadruplex-Strukturen und lassen den Schluss zu, dass G-Quadruplexe normal vorkommende Strukturen in einer Zelle darstellen, die auf- und auch wieder abgebaut werden [64].

RNA ist ebenfalls in der Lage Quadruplexe auszubilden. Beispielsweise spielen RNA-Quadruplexe bei der Translation eine Rolle. Im 5'-UTR-Bereich des *N-ras*-Onkogens konnte eine Quadruplex-Struktur nachgewiesen werden, die zu einer signifikanten Reduktion des gebildeten Proteins führt [77]. Arora *et al.* konnten schließlich zeigen, dass der sogenannte Zic-1 RNA-G-Quadruplex die Proteinsynthese innerhalb der Zelle reprimiert [78].

### 1.3.2 NACHWEIS VON QUADRUPLEX-STRUKTUREN

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) stellt eine indirekte Methode zur Charakterisierung der Topologie von Quadruplexen in Lösung dar. Zirkular polarisiertes Licht wird von optisch aktiven Molekülen absorbiert. Die Differenz des links und rechts polarisierten Lichts verschiedener Wellenlängen wird graphisch als Funktion der Wellenlänge dargestellt (Elliptizität). Im Falle von parallel-angeordneten Quadruplexen weist die resultierende Funktion ein positives Maximum bei 264 nm und ein negatives Minimum bei 240 nm auf. Hingegen weisen anti-parallele Quadruplexe ein positives Maximum bei 295 nm und ein negatives Minimum bei 265 nm auf [79-82]. In Abbildung 10 sind exemplarisch CD-Messungen eines parallelen (a) und eines anti-parallelen (b) Quadruplexes dargestellt.



**Abbildung 10: CD-Spektren von Quadruplex ausbildenden Strukturen nach [81].** Sind innerhalb des Quadruplexes die einzelnen Stränge parallel zueinander angeordnet, so ergeben sich nach einer CD-spektroskopischen Untersuchung ein negatives Minimum bei 240 nm und ein positives Maximum bei 264 nm (a). Sind die einzelnen Stränge anti-parallel angeordnet, so ergeben sich ein positives Maximum bei 295 nm und ein negatives Minimum bei 265 nm (b). Durch Erhitzung der Moleküle, wird die Quadruplex-Struktur destabilisiert, was eine Verringerung der maximalen Elliptizität zur Folge hat.

## 2. ZIELSETZUNG

Das Zytokin Interleukin-6 und der Interleukin-6-Rezeptor nehmen im Zusammenhang zahlreicher inflammatorisch und neurologisch begründeter Krankheiten, sowie Krebs und pathogenen Infektionen eine bedeutende Rolle ein. Dies liegt nicht nur an der multifunktionalen Eigenschaft des IL-6, sondern auch am IL-6R, der durch eine von der Zelloberfläche losgelöste Form weitere Zellen zur Stimulation anregen kann, die gp130 auf der Zelloberfläche tragen.

In früheren Studien der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn wurden sowohl RNA- als auch DNA-Aptamere mit hoher Spezifität und Affinität für den löslichen Interleukin-6-Rezeptor selektiert und charakterisiert. Es gelang, die Aptamere auf eine Länge von 19 bzw. 15 Nucleotide zu verkürzen, ohne die Bindungseigenschaften der Aptamere zum Zielmolekül zu beeinträchtigen [57, 58]. Im Gegensatz zum DNA-Aptamer war das RNA-Aptamer in der Lage, Zielzellen zu binden, die den nativen IL-6-R auf der Zelloberfläche präsentierten.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lag zum einen in der weiterführenden Charakterisierung der Aptamere bezüglich ihrer Struktur und Stabilität. Dazu sollte zusätzlich das RNA-Analogon zum DNA-Aptamer auf Struktur und Funktionalität untersucht werden.

Zum anderen sollte die Verwendung des RNA-Aptamers als Vehikel zur zellspezifischen Wirkstoffinternalisierung im Fokus stehen. Dazu war es zunächst notwendig, die Spezifität der Aptamer-Bindung an Zielzellen zu bestimmen. Folgend sollte eine mögliche Internalisierung des Aptamers in das Zellinnere sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch nachgewiesen werden. Im Falle einer Internalisierung sollte das Aptamer mit Wirkstoffen, d. h. fluoreszierenden Substanzen, Toxinen und regulatorisch wirkenden RNAs (siRNAs), gekoppelt werden. Es sollten Studien folgen, die den Aptamer-vermittelten Transport dieser resultierenden Chimären ins Innere von Interleukin-6-Rezeptor-tragenden Zellen belegten.

Abschließend sollten Aptamer-Varianten identifiziert werden, die spezifisch den IL-6R binden, jedoch nicht inhibitorisch auf die HIV-1 Integrase wirken und umgekehrt.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 CHEMIKALIEN

Verwendete Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und AppliChem (Darmstadt) erworben.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Disuccinimidyl-Suberat (DSS)	Thermo Scientific (Bonn)
Sulfo-SMCC	Thermo Scientific
SPDP	Thermo Scientific
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Tocris Bioscience (Bristol, England)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Atto465-Biotin	ATTO-TEC (Siegen)
Atto520-Biotin	ATTO-TEC
Atto550-Biotin	ATTO-TEC
Atto635-Biotin	ATTO-TEC

#### 3.2 PUFFER UND MEDIEN

Tabelle 3: Puffer für biochemische Methoden. RNasefrei.

Bezeichnung	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 57% (v/v) Essigsäure
2x RNA-Loading-Dye	95% (v/v) Formamid, 0,025% (w/v) SDS, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 0,025% (w/v) Xylene Cyanol FF, 0,5 mM EDTA
6x DNA Loading-Dye	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,03% (w/v) Bromphenolblau, 0,03% (w/v) Xylene Cyanol FF, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA
5x PBS-Puffer	0,68 mM NaCl, 13,5 mM KCl, 32,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
HIV-1 Integrase Bindepuffer	20 mM Hepes, pH 7,5, 10 mM DTT, 7,5 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM NaCl, 0,05% (v/v) Nonidet P40
HIV-1 Integrase Assay Puffer	20 mM Hepes pH 7,5, 5 mM DTT, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 75 mM NaCl, 15% DMSO, 5% PEG 8000
Selektionspuffer	1x PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,4
SPR-Puffer	1x PBS, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,4, 0,01% (v/v) Tween
SPR-Acetatlösung	10 mM Natriumacetat, pH 5,5
SPR-Ethanolamin	1 M Ethanolamin, pH 8,5
Elutionspuffer	0,6 M Natriumacetat
5x Transkriptionspuffer	200 mM Tris-HCl, pH 7,4
Aminohexansäure-Puffer	40 mM Aminohexansäure, 20% (v/v) Methanol
NB-Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM EDTA
20x SSC-Puffer	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0

Tabelle 4: Puffer für Proteinbiochemische Methoden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
4x Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M TRIS, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
APS Stammlösung	10% APS
5x SDS-Laufpuffer	0,125 M TRIS, 0,96 M Glycin, 0,5% (w/v) SDS
3x SDS-Loading-Dye (NEB)	181,5 mM TRIS-HCl 6% (w/v), SDS, 30% (v/v) Glycerin, pH 7,0
Coomassie-Färbelösung	43% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie-Entfärber	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Silberfärbung-Fixierlösung	30% (v/v) Ethanol, 15% (v/v) Essigsäure, frisch angesetzt
Silberfärbung-Inkubationslösung	0,5 M Natriumacetat, 25% (v/v) Ethanol bei Gebrauch: 100 mL Fixierlösung, 0,2 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 25% (v/v) Glutardialdehyd
Silberfärbung-Färbelösung	5,9 mM Silbernitrat bei Gebrauch: 100 mL Färbelösung, 30 µL 37% Formaldehyd
Silberfärbung-Entwicklerlösung	0,24 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 11,5 bei Gebrauch: 100 mL Färbelösung, 30 µL 37% Formaldehyd
Silberfärbung-Stopplösung	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
CAPS-Puffer	10 mM CAPS, pH 11
5 x TBS-Puffer	1 M Tris-HCl, pH 7,5, 750 mM NaCl
Blockpuffer	0,5% (w/v) bovines Serum Albumin (BSA) in 1x TBS
Reaktionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 4 mM MgCl <sub>2</sub>
BCIP	0,5% (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat in DMF
NBT	0,1% (w/v) NBT in Reaktionspuffer
Bindepuffer	20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, pH 7,4
Elutionspuffer	20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 7,4

### 3.3 NUCLEOTIDE UND OLIGONUCLEOTIDE

Tabelle 5: Hersteller von Nucleotiden, Radionucleotiden und Oligonucleotiden.

Bezeichnung	Hersteller
[5'- <sup>32</sup> P]-pCp	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[α- <sup>32</sup> P]-GTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
[γ- <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
Aminomodifizierte RNA	IBA (Göttingen)
Biotinylierte RNA	IBA
DNA aus Lachssperma	Sigma-Aldrich
DNA-Oligonucleotide (fluoreszenzmarkiert)	Metabion (Martinsried)
RNA-Oligonucleotide (fluoreszenzmarkiert)	IBA
Ribonucleosidtriosphate (NTPs)	Roth
DNA-Oligonucleotide (unmarkiert)	Invitrogen (Darmstadt)
RNA-Oligonucleotide (unmarkiert)	IBA

**Tabelle 6: Verwendete DNA- und RNA-Oligonucleotide.** Punktmutationen *fett* und *kursiv*, Linkerregionen *kursiv* und komplementäre Bereiche unterstrichen. Oligonucleotide wurden in Wasser zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AE117	d(ACTGCTAGAGATTTTCCACAC)
AID-1	d(GGG TGG GTG GGT GGG T)
AIR-1	GGG UGG GUG GGU GGG U
AID-1 rev	d(ACCC ACC CAC CCA CCC <i>TAT AGT GAG TCG TAT TAG A</i> )
AID-1-G10T	d(GGG TGG GTG <i>TGT</i> GGG T)
AID-1-G10T rev	d(ACC CAC ACA CCC ACC <i>CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA</i> )
AIR-1-G10U	GGG UGG GUG <i>UGU</i> GGG U
AID-1-G14T	d(GGG TGG GTG GGT <i>GTG</i> T)
AID-1-G14T rev	d(ACA CAC CCA CCC ACC <i>CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA</i> )
AIR-1-G14U	GGG UGG GUG GGU <i>GUG</i> U
AID-1-G2T	d( <i>GTG</i> TGG GTG GGT GGG T)
AID-1-G2T rev	d(ACC CAC CCA CCC ACA <i>CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA</i> )
AIR-1-G2U	<i>GUG</i> UGG GUG GGU GGG U
AID-1-G6A	d(GGG TGA GTG GGT GGG T)
AID-1-G6T	d(GGG <i>TGT</i> GTG GGT GGG T)
AID-1-G6T 3'-Alexa488	d(GGG <i>TGT</i> GTG GGT GGG)-Alexa488
AID-1-G6T rev	d(ACC CAC CCA CAC ACC <i>CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA</i> )
AID-1-G6T_G14T	d(GGG TGA GTG GGT <i>GAG</i> T)
AIR-1-G6U	GGG <i>UGU</i> GUG GGU GGG U
AID-1-T	d(GGG TGG GTG GGT GGG)
AID-1-T 3'-Alexa488	d(GGG TGG GTG GGT GGG)-Alexa488
AIR-1-U	GGG UGG GUG GGU GGG
5'-Amino-AIR-3A	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -GGG GAG GCU GUG GUG AGG G
5'-Dimer	d(GGG TGG GTG GGT GGG <i>GAT TTG GCA GGG TGG GTG GGT GGG GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC C</i> )
5'-Dimer 1xG6T	d(GGG TGG GTG <i>TGT</i> GGG <i>GAT TTG GCA GGG TGG GTG GGT GGG GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC C</i> )
5'-Dimer 2xG6T	d(GGG TGG GTG <i>TGT</i> GGG <i>GAT TTG GCA GGG TGG GTG TGT GGG GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC C</i> )
5'-Monomer	d(GGG TGG GTG GGT GGG <i>GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC C</i> )
5'-Monomer G6T	d(GGG TGG GTG <i>TGT</i> GGG <i>GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC C</i> )
5'-Amino-AIR-3A-G17U	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -GGG GAG GCU GUG GUG <i>AUG</i> G
5'-Amino-AIR-3A-Shuffle	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -GGU GUG UGG GGA GGG CGA G
Dimer2Side	d(GGG TGG GTG GGT GGG <i>GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC CGA TTT GGC ATG GGT GGG TGG GTG GG</i> )
Dimer2Side 1xG6T	d(GGG TGG GTG GGT GGG <i>GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CTC CCC GAT TTG GCA TGG GTG GGT GTG TGG G</i> )
Dimer2Side 2xG6T	d(GGG TGG GTG <i>TGT</i> GGG <i>GAT TTG GCA CCA TCA CCA CAG CCT CCC CGA TTT GGC ATG GGT GGG TGT GTG GG</i> )
G1 NK3	d( <i>GTT TGT GTT TGT GTG</i> T)

G1 Poly GT	d(GTG TGT GTG TGT GTG T)
AIR-3A	GGG GAG GCU GUG GUG AGG G
AIR-3A 5'-Biotin	Biotin-GGG GAG GCU GUG GUG AGG G
AIR-3A -Atto647N	Atto647N-GGG GAG GCU GUG GUG AGG G
AIR-3A-Cy5	Cy5-GGG GAG GCU GUG GUG AGG G
AIR-3A komplementär	d(CCA TCA CCA CAG CCT CCC C)
AIR-3A-Shuffle rev	d(CTC GCC CTC CCC ACC ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAG A)
AIR-3A 3'-Biotin (Capture)	d(GGG GAG GCT GTG GUG ATG G)-Biotin
AIR-3A-G17T Cy5	Cy5-GGG GAG GCT GTG GUG ATG G
AIR-3A-G17U	GGG GAG GCU GUG GUG AUG G
AIR-3A-G17U 5'-Biotin	Biotin-GGG GAG GCU GUG GUG AUG G
AIR-3A-G17U Atto647N	Atto647N-GGG GAG GCU GUG GUG AUG G
AIR-3A-G17U Cy5	Cy5-GGG GAG GCU GUG GUG AUG G
AIR-3A-G17/18U	GGG GAG GCU GUG GUG AUU G
SRB2m	GGA ACC UCG CUU CGG CGA UGA UGG AGA GGC GCA AGG UUA ACC GCC UCA GGU UCC
ODN70	d(GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT)
ODN71	d(GTGTGGAAAATCTCTAGCA)
T7 Primer	d(TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG)
TBA	d(GGT TGG TGT GGT TGG)
siRNA-PLK1 anti-Sense-Strang	GGG CGG CUU UGC CAA GUG CUU
siRNA-PLK1 Sense-Strang	<u>GGC CCU CAC CAC AGC CUC CCC GGA AUU AAG CAC UUG GCA</u> AAG CCG CCC UU
PLK1-Pass1 fw	d(AAT GCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG GCT TTG CCA AGT GCT T)
PLK1-Pass1 rev	d(AAG CAC TTG GCA AAG CCG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAG CAT T)
PLK1-Guide1 fw	d(AAT GCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CCC TCA CCA CAG CCT CCC CGG AAT TAA GCA CTT GGC AAA GCC GCC CTT)
PLK1-Guide1 rev	d(AAG GGC GGC TTT GCC AAG TGC TTA ATT CCG GGG AGG CTG TGG TGA GGG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT)
T30175	d(GTGGTGGGTGGGTGGGT)

### 3.4 PROTEINE UND ENZYME

Tabelle 7: Verwendete Proteine.

Bezeichnung	Größe	Hersteller
Gelonin	30 kDa	Enzo Life Sciences (Lausen)
hIL-6	20,9 kDa; 184 AS	Merck
Hyper-IL-6	57 kDa; 408 AS	Prof. Dr Rose-John [32]
HIV-1 Integrase	32 kDa	BioCat
IL-3	28 kDa	Merck
mCherry	30 kDa	eigene Reinigung
mRFP1	27,5 kDa	eigene Reinigung

Tabelle 8: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
FastAP thermosensitive alkaline Phosphatase	Fermentas (Leon-Rot)
RNase T1	Fermentas
T4-Polynucleotid-Kinase (PNK)	Fermentas
T7-RNA-Polymerase	Daniela Ploen [83]
T7-RNA-Ligase	Fermentas

### 3.5 ANTIKÖRPER

Tabelle 9: Verwendete Antikörper. Antikörper wurden für Western-Blot-Analysen und durchflusszytometrische Untersuchungen verwendet.

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Tetra-His mouse IgG <sub>1</sub>	1 : 2.000	Qiagen (Hilden)
Monoclonal anti-human IL-6R	1 : 350	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
Monoclonal anti-human gp130	1 : 350	R&D Systems (Wiesbaden)
pSTAT3 (Tyr 705)-R rabbit polyclonal IgG	1 : 2.000	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Actin (I-19)-R rabbit polyclonal IgG	1 : 10.000	Santa Cruz Biotechnology
Mouse anti-human PLK1 monoclonal	1 : 2.000	AbFrontier
Anti-mouse IgG Alkine Phosphatase	1 : 10.000	Sigma-Aldrich
Anti-rabbit IgG Alkine Phosphatase	1 : 10.000	Sigma-Aldrich
Goat anti-mouse Ig –APC	1 : 350	BD Pharmingen (Heidelberg)
Goat anti-mouse IgG <sub>1</sub> -FITC	1 : 350	Santa Cruz Biotechnology

### 3.6 FLUOROPHORE

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Fluorophore, deren Anregungs- und Emissions-Wellenlängen sowie deren Anwendung.

Tabelle 10: Übersicht verwendete Fluorophore.

Bezeichnung	Anregung	Emission	Verwendung
alarmaBlue reduziert	530-560 nm	590 nm	Proliferationstest
APC	650 nm	660 nm	Antikörper-Markierung
Alexa488	501 nm	523 nm	RNA-Markierung
Atto647N	644 nm	669 nm	RNA-Markierung
Atto465	453 nm	508 nm	Streptavidin-Konjugation
Atto520	516 nm	538 nm	Streptavidin-Konjugation
Atto550	554 nm	576 nm	Streptavidin-Konjugation
Atto635	629 nm	657 nm	Streptavidin-Konjugation
Cy5	649 nm	670 nm	RNA-Markierung
FITC	506 nm	529 nm	Antikörper-Markierung
GFP	484 nm	510 nm	fluoreszierendes Protein
mCherry	587 nm	610 nm	fluoreszierendes Protein
mRFP1	584 nm	607 nm	fluoreszierendes Protein

### 3.7 KITS UND SÄULEN

Tabelle 11: Verwendete Kits und Säulen.

Bezeichnung	Hersteller
AlarmaBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
BCA Assay: Protein Quantification Kit	Uptima (Frankreich)
Bio-Spin Columns with Bio-Gel P-6	BioRad (München)
Filtropur S 0, 2	Sarstedt (Nümbrecht)
HisTalon Cartridge	Clontech (Heidelberg)
TurboFect Protein Transfection	Fermentas

### 3.8 ZELLINIEN

**Baf/3-Zellen** sind murine prä-B-Zellen. Diese Suspensionszellen sind in ihrem Wachstum vom Zytokin IL-3 abhängig.

**Baf\_gp130-Zellen** sind stabil transfizierte Baf/3-Zellen, die den gp130-Rezeptor produzieren und von Hyper-IL-6 abhängig sind.

**Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen** sind stabil transfizierte Baf/3 Zellen, die den gp130- und den Interleukin-6-Rezeptor produzieren und vom humanen Zytokin IL-6 abhängig sind. Die Baf\_gp130 und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurden von Herrn Professor Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

**Hek293-Zellen** sind humane embryonale Nierenzellen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 90% DMEM Medium mit 10% FKS und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

**HeLa-Zellen** sind adhärent wachsende Zellen, die humanen Gebärmutterhalszellen entstammen.

**HepG2-Zellen** entstammen einem humanen Leberkarzinom und wachsen adhärent.

**U937-Zellen** entstammen einem humanen histiozytären Lymphom. Die Suspensionszellen sind rund bis polygonal.

Tabelle 12: Anzahl der hIL-6-Rezeptoren verschiedener Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	hIL-6R pro Zelle	Literatur
Baf_gp130	Maus	keine	
Baf_gp130_hIL-6R	Maus	nicht untersucht	
Hek293	Mensch	keine	
HeLa	Mensch	50 - 100	[84]
HepG2	Mensch	500 - 2000	[11, 84]
U937	Mensch	2800	[85]

Tabelle 13: Zellkulturmedien und Zusätze.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM	PAA (Cölbe)
RPMI 1640	PAA
Foetal Bovine Serum Standard Quality (FKS)	PAA
100 x Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA
Trypsin/EDTA	PAA

### 3.9 BAKTERIENSTAMM

*E. coli* BL21 (DE3), Invitrogen

Genotyp: fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta$ hdsS  $\lambda$  DE3 =  $\lambda$  sBamHIo  $\Delta$ EcoRI-B  
int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21  $\Delta$ nin5

### 3.10 VEKTOREN

#### pRSETmCherry

Der pRSETmCherry Vektor codiert für das fluoreszierende Protein mCherry. *E. coli* BL21 Zellen wurden mit dem Plasmid pRSETmCherry transformiert und wiesen eine Ampicillinresistenz auf. Das Protein mCherry wurde mit einem N-terminalen 6x His-Tag fusioniert.

#### pRSETmRFP1

Der pRSETmRFP1 Vektor codiert für das fluoreszierende Protein mRFP1. *E. coli* BL21 Zellen wurden mit dem Plasmid pRSETmRFP1 transformiert und wiesen eine Ampicillinresistenz auf. Das Protein mRFP1 wurde mit einem N-terminalen 6x His-Tag fusioniert.

Die Vektoren pRSETmCherry und pRSETmRFP1 wurden von Roger Tsien (University of California) zur Verfügung gestellt.

### 3.11 PROTEIN UND DNA-MARKER

<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>PageRuler Unstained Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder</i>	Fermentas

## 4. METHODEN

### 4.1 PRÄPARATION VON NUCLEINSÄUREN

#### 4.1.1 *IN VITRO* T7-TRANSKRIPTION

RNA wurde über *in vitro* T7-Transkription hergestellt (Tabelle 14). Dabei diente doppelsträngige DNA als Template, die die Promoter-Sequenz der T7-RNA-Polymerase enthielt. Die T7-Transkription fand bei 37 °C über Nacht statt. Zur Inaktivierung der T7-RNA-Polymerase wurde diese für zehn Minuten bei 80 °C erhitzt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für *in vitro* T7-Transkription.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
1 µM DNA	10 µL	0,1 µM
5 x Transkriptionspuffer	20 µL	40 mM Tris-HCl
100 mM MgCl <sub>2</sub>	15 µL	15 mM
25 mM NTP-Mix	7,5 µL	1,8 mM
T7-RNA-Polymerase	2,5 µL	
Aqua dest.	ad 100 µL	-

#### 4.1.2 ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON NUCLEINSÄUREN IN POLYACRYLAMIDGELEN

Doppelsträngige DNA, RNA sowie DNA/RNA-Hybride als auch RNA/Aptamer-Komplexe wurden über native Polyacrylamidgele (Tabelle 15) getrennt, wobei die Proben mit 6x DNA-Loading-Dye versetzt wurden. Die Nucleinsäuren wurden in 1x TAE-Puffer bei 150 V und 30 mA pro Gel getrennt. Zur Detektion der Nucleinsäuren wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt (4 µg Ethidiumbromid pro mL 1x TAE).

Tabelle 15: Zusammensetzung nativer Polyacrylamidgele.

Komponente	5%	10%	15%
50x TAE	1x	1x	1x
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1	-	10%	15%
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1	5%	-	-
TEMED (v/v)	0,1%	0,1%	0,1%
APS (w/v)	0,1%	0,1%	0,1%

Einzelsträngige DNA und RNA wurden über denaturierende Polyacrylamidgele elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde wie in Tabelle 15 beschrieben hergestellt, wobei der Zusatz von 8 M Harnstoff der Denaturierung diente. Vor Gebrauch der Gele

wurde eine Prä-Elektrophorese bei 12 bis 20 Watt durchgeführt. Die Proben wurde mit 2x RNA-Loading-Dye versetzt und für fünf Minuten bei 72 °C erhitzt. Die erhitzten Proben wurden anschließend aufgetragen und in 1x TAE bei 12 bis 20 Watt elektrophoretisch getrennt. Fluoreszenzmarkierte DNA- oder RNA-Fragmente wurden in *Loading-Dye* ohne Farbstoff aufgenommen und anschließend das Gel unter Verwendung des *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad und des Programms *Quantity One* dokumentiert.

#### **4.1.3 ISOLIERUNG VON RNA- UND DNA-FRAGMENTEN AUS POLYACRYLAMIDGELEN**

Zur Reinigung von Nucleinsäuren z. B. nach einer T7-Transkription wurden diese gelelektrophoretisch getrennt und über UV-Shadowing detektiert. Dabei wurde das Gel auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt. Diese Platte enthielt einen mit UV-Licht (254 nm) anregbaren Fluoreszenzfarbstoff. Nucleinsäure-Banden im Gel absorbieren das UV-Licht und führten an dieser Stelle zu einer Fluoreszenzlöschung, die als Schatten auf der Platte ersichtlich waren. Die entsprechenden Banden wurden markiert und das Gel herausgeschnitten. Die Nucleinsäuren wurden über Diffusionselution aus dem Gel eluiert. Dazu wurde das zerkleinerte Gel zweimal in 0,6 M Natriumacetat bei 37 °C für je eine Stunde geschüttelt. Der die Nucleinsäuren enthaltende Überstand wurde anschließend über Isopropanol präzipitiert (4.1.4).

#### **4.1.4 NUCLEINSÄUREPRÄZIPITATION ÜBER ISOPROPANOL**

Nucleinsäuren wurden über eine Präzipitation mit Isopropanol gefällt. Dazu wurden die Proben mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat und mit einem Volumen kalten Isopropanol versetzt. Als Co-Präzipitant wurde dem Fällungsansatz Glykogen hinzu gegeben. Die Präzipitation erfolgte für 30 Minuten oder über Nacht bei -20 °C. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 20%igem Ethanol gewaschen und erneut für zehn Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde getrocknet und in Wasser aufgenommen.

#### **4.1.5 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER RNA KONZENTRATION**

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgte am ND-1000 der Firma NanoDrop.

## 4.2 MODIFIKATION VON RNA UND DNA

### 4.2.1 DEPHOSPHORYLIERUNG VON RNA

Zur radioaktiven Markierung von RNA über die T4-Polynucleotid-Kinase (PNK), wurde zunächst eine Dephosphorylierung des jeweiligen 5'-Endes mittels der FastAP thermosensitive alkaline Phosphatase (Fermentas) durchgeführt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Enzym Hitzeinaktiviert (fünf Minuten bei 75 °C) und über Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt (4.2.2).

Tabelle 16: Dephosphorylierung.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
200 pmol RNA	x $\mu\text{L}$	200 pmol
10x FastAP Puffer	10 $\mu\text{L}$	1x
Fast AP (1 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	0,05 U
Aqua dest.	ad 20 $\mu\text{L}$	

### 4.2.2 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zur Entfernung von Enzymen z. B. nach der Dephosphorylierung von RNA (4.2.1) verwendet. Dazu wurde die zu extrahierende Probe mit Wasser auf ein Volumen von 200  $\mu\text{L}$  gebracht, mit gleichem Volumen Phenol (Roth) versetzt und gemischt. Zur Trennung der wässrigen und der organischen Phase wurde für eine Minute bei 11.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und die Phasen erneut über Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde schließlich mit Isopropanol präzipitiert (4.1.4) und in Wasser gelöst.

### 4.2.3 RADIOAKTIVE 5'-ENDMARKIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN MITTELS

#### *T4-POLYNUCLEOTIDKINASE*

Die radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA und RNA erfolgte unter Verwendung der T4-PNK (Fermentas) und  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Die Markierungsreaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Das Enzym wurde über Hitze inaktiviert (5 min, 80 °C). Die Reinigung der markierten DNA bzw. RNA wurde wie in 4.2.6 und 4.1.4 beschrieben durchgeführt.

Zur Herstellung von radioaktiv markierten Sonden wurde der Reaktionsansatz über eine *Bio-Spin Column with Bio-Gel P-6* (Biorad) nach Herstellerangaben gereinigt.

**Tabelle 17: Radioaktive 5' End-Markierung von DNA- und RNA-Fragmenten.**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
1 $\mu$ M ssDNA	10 $\mu$ L	0,5 $\mu$ M
10x PNK Puffer A	2 $\mu$ L	1x
[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ Ci/ $\mu$ L
PNK	1 $\mu$ L	10 U
Aqua dest.	ad 20 $\mu$ L	

#### 4.2.4 RADIOAKTIVE 3'-ENDMARKIERUNG VON RNA MITTELS T4-RNA-LIGASE

Zur radioaktiven 3'-Endmarkierung von RNA und DNA wurde die T7-RNA-Ligase (Fermentas) und Cytidin-3', 5'-bis[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-phosphat ([5'- $^{32}$ P]pCp) verwendet. Die Reinigung der markierten DNA bzw. RNA wurde wie in 4.2.6 und 4.1.4 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 18: Radioaktive 3'End-Markierung von RNA.**

Komponente	Volumen		Endkonzentration
RNA	-	x $\mu$ L	5 $\mu$ M
10 $\mu$ M DNA	10 $\mu$ L	-	0,5 $\mu$ M
10x T4-RNA-Ligase Puffer	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1x
[5'- $^{32}$ P]pCp (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ Ci/ $\mu$ L
T4-RNA-Ligase (12 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,6 U/ $\mu$ L
Aqua dest.	ad 20 $\mu$ L	ad 20 $\mu$ L	

#### 4.2.5 RADIOAKTIVE MARKIERUNG ÜBER IN VITRO T7-TRANSKRIPTION

Die radioaktive Markierung von RNA fand unter Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-GTP während der in vitro T7-Transkription (Tabelle 19) statt, die über Nacht bei 37 °C durchgeführt wurde. Die anschließende Reinigung der markierten DNA bzw. RNA wurde wie in 4.2.6 und 4.1.4 beschrieben durchgeführt und die Markierung über eine Gelelektrophorese (4.1.2) und anschließender Autoradiographie kontrolliert. Dazu wurde das Gel in eine Folie gelegt und in eine entsprechende Kassette mit einem Phosphoimager Screen exponiert. Der Screen wurde mit einem Phosphoimager der Firma BioRad gescannt und die Daten mit der Software Quantity One ausgewertet.

Tabelle 19: Radioaktive Markierung von RNA mittels *in vitro* T7-Transkription.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
1 $\mu$ M DNA	10 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
5x Transkriptionspuffer	20 $\mu$ L	40 mM Tris-HCl
100 mM MgCl <sub>2</sub>	15 $\mu$ L	15 mM
25 mM ATP, UTP, GTP	10 $\mu$ L	2,5 mM
25 mM GTP	1 $\mu$ L	0,25 mM
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-GTP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0,1 $\mu$ Ci/ $\mu$ L
T7-RNA-Polymerase	2,5 $\mu$ L	
Aqua dest.	ad 100 $\mu$ L	-

#### 4.2.6 ISOLATION VON RADIOAKTIV MARKIERTEN RNA- UND DNA-FRAGMENTEN AUS POLYACRYLAMIDGELEN

Die Reinigung radioaktiv-markierter Nucleinsäuren aus PAA-Gelen erfolgte nach autoradiographischer Detektion. Das Gelstück der zu reinigenden Nucleinsäure-Bande wurde ausgeschnitten und einer Diffusionselution Isopropanol-Präzipitation unterzogen (4.1.3, 4.1.4).

### 4.3 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON APTAMEREN

#### 4.3.1 ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

Bei der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) handelt es sich um eine Absorptionsspektroskopie, bei der die Absorption von links und rechts zirkulär polarisiertem Licht einer optisch aktiven Substanz gemessen wird. Zur Charakterisierung der Topologie von G-Quadruplexen diente die CD-Spektroskopie als indirekter Nachweis. In einer graphischen Darstellung der Ergebnisse wird die resultierende Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Ein parallel angeordneter G-Quadruplex weist ein positives Maximum bei 264 nm und ein negatives Minimum bei 240 nm auf. Hingegen weist ein G-Quadruplex in antiparalleler Struktur ein positives Maximum bei 295 nm und ein negatives Minimum bei 265 nm auf. Die CD-Messungen wurden am *Aviv Instruments Circular Dichroism Spectrometer* (Model 215) durchgeführt. Dazu wurden 500  $\mu$ L Nucleinsäurelösung (5  $\mu$ M) bei 25 °C im Spektralbereich von 200 bis 320 nm vermessen. Zur graphischen Darstellung wurden jeweils zwei Messungen gemittelt.

## 4.4 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON APTAMER-PROTEIN-INTERAKTIONEN

### 4.4.1 FILTERBINDUNGSANALYSE

Zur Charakterisierung von Aptamer-Protein-Interaktionen und zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurden Filterbindungsanalysen (FBA) durchgeführt [86]. Die Durchführung von FBAs erfolgte unter radioaktiven Bedingungen. Die radioaktiv-markierten Aptamere wurden am Szintillationszähler (Tri-Carb 2500 TR Liquid Scintillationcounter) vermessen und jeweils 4.000 cpm mit steigenden Konzentrationen des Zielproteins für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Selektionspuffer oder HIV-1 Integrase Bindungspuffer [87] inkubiert. Die Nitrozellulose-Membran (Roth) wurde im Falle der DNA-Aptamere für 15 Minuten in 0,4 M KOH, im Fall der RNA-Aptamere für 30 Minuten in Amino-hexansäure-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran sowie ein Filterpapier in Puffer getränkt und in eine 96-Well-Dot-Blot Apparatur (Schleicher&Schüll) gespannt. Durch Unterdruck wurden je 200 µL Selektionspuffer pro Bohrung durch die Membran gesaugt und schließlich die Aptamer-Protein Lösung aufgetragen und erneut zweimal mit 200 µL Puffer gewaschen. Es folgten die Trocknung der Membran und das zweimalige Auftragen der 100% Kontrolle. Zur Detektion der verbliebenen Radioaktivität auf der Membran wurde diese zusammen mit einem Phosphoimager-Screen in einer Kassette exponiert und mit dem Phosphoimager gescannt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *Quantity One* und die graphische Auswertung zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit der Software *GraphPad*.

### 4.4.2 OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZ-ANALYSE

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ermöglicht es, die Wechselwirkung zweier unmarkierter Komponenten in Echtzeit zu untersuchen. Dazu wird einer der Interaktionspartner auf einer mit Gold beschichteten Oberfläche immobilisiert und die wechselwirkende Komponente über diese Oberfläche geleitet. Polarisiertes Licht wird von der Goldoberfläche vollständig in einem bestimmten Winkel reflektiert. Die Änderung der Masse an der Chipoberfläche verändert den Winkel des reflektierten Lichts, das von einem Detektor aufgenommen wird und führt zur Änderung der Oberflächenplasmonresonanz. Die Ergebnisse werden in einem Diagramm dargestellt. Die Signalstärke ist proportional zur gebundenen Masse an der Chipoberfläche und wird in Resonanz-Einheiten (RU) angegeben, wobei  $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$ .

Die Messungen wurden am SPR2 der Firma SierraSensors (Hamburg) durchgeführt. Es wurde zu Ermittlung der Bindungseigenschaften zwischen verschiedenen Aptameren mit dem hIL-6-Rezeptor eingesetzt.

Auf einem Carboxymethlen funktionalisierten Amino-Chip (SierraSensors) wurde über EDC/NHS das zu untersuchende Protein über primäre Amine (Lysin) an die Chip Oberfläche immobilisiert. Dazu wurde das Gerät mit dem SPR-Puffer gespült, der Chip eingesetzt und erneut mit SPR-Puffer gespült. Um Luftblasen im System zu entfernen, wurde entgast und folgend der Chip im Gerät positioniert. Zur EDC/NHS-Aktivierung der Chipoberfläche wurden 200  $\mu\text{L}$  frisch angesetzte EDC/NHS-Lösung (400 mM EDC, 100 mM NHS) mit einer Fließgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  über den Chip geleitet. Anschließend wurde für 180 s mit dem SPR-Puffer gewaschen. Die zwei Flusszellen des Chips ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung einer Referenz. Zur Immobilisierung der Proteine wurden diese in SPR-Acetat-Puffer (10 mM Natriumacetat, pH 5,5) auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  verdünnt und nacheinander 200  $\mu\text{L}$  über die Flusszellen 1 und 2 mit einer Fließgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  geleitet. Dabei wurde als Referenz-Protein humanes IL-6 in der Flusszelle 1 und Hyper-IL-6 in der Flusszelle 2 immobilisiert. Abschließend wurden freie Stellen auf dem Chip mit 150  $\mu\text{L}$  SPR-Ethanolamin blockiert (25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

Die Messung wurde anschließend manuell durchgeführt, indem 50  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Nucleinsäure-Lösung (1  $\mu\text{M}$  in SPR-Puffer) mit einer Fließgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  über den Chip geleitet wurde. Anschließend wurden gebundene Nucleinsäuren mittels HCl (10  $\mu\text{L}$  100 mM HCl für 180 s; danach 20  $\mu\text{L}$  HCl für 400 s) vom Chip entfernt. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit der Software *TraceDrawer* der Firma Sierra Sensors statt.

#### **4.4.3 HIV-1 INTEGRASE INHIBITIONSANALYSE**

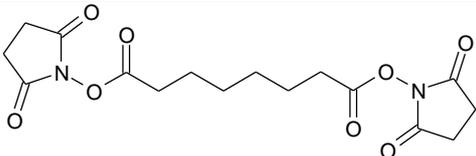
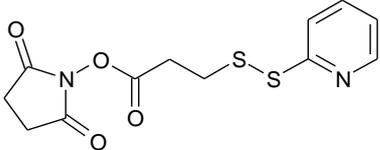
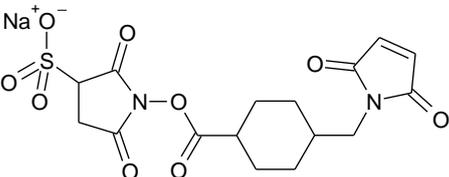
Zur Untersuchung inhibitorisch wirkender Aptamere wurde die 3'-Processing-Aktivität der HIV-1 Integrase betrachtet. Die Inhibitionsanalyse der HIV-1 Integrase wurde nach [60, 87, 88] durchgeführt. Die dazu verwendeten Oligonucleotide entsprachen dem 5U-Ende des HIV *long terminal repeats*. ODN70 wurde am 5'-Ende mit  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP radioaktiv markiert (4.2.3) und nach einer Gelreinigung (4.2.6) an AE177 hybridisiert. Zur Untersuchung der 3'-Processing-Aktivität wurden 10 nM radioaktivmarkiertes Substrat mit 500 nM HIV-1 Integrase in HIV-1 Integrase Assay-Puffer bei 37 °C für

30 min inkubiert und die Reaktion mit der Zugabe von 2x *RNA-Loading-Dye* und anschließender Hitzeinaktivierung gestoppt. Während des 3'-Processings werden vom 21-mer zwei Nucleotide abgespalten. Das 21- und das entstandene 19-mer können gelektrophoretisch getrennt werden. Zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Aptameren auf die 3'-Processing-Aktivität wurde die HIV-1 Integrase mit steigenden Mengen an Aptamer (0-1230 nM) für 30 min und bei 37 °C prä-inkubiert, wobei anschließend das Substrat hinzugefügt wurde. Das Maß der Inhibition wurde über  $100 \cdot (1 - (D-C)/(N-C))$  berechnet, wobei C, N und D jeweils das 3'-Processing-Produkt darstellen: für die DNA allein (C), DNA mit Integrase (N) und in Anwesenheit des Inhibitors (D). Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurde die prozentuale Inhibition gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und die 50%ige Inhibition bestimmt.

#### 4.4.4 CROSSLINK VON APTAMEREN UND PROTEINEN

Zum Crosslink von Aptamer und Protein wurden drei verschiedene Crosslinker verwendet, die der folgenden Tabelle zu entnehmen sind.

Tabelle 20: Übersicht verwendeter Crosslinker und deren Strukturen.

Bezeichnung	Struktur	Reaktive Gruppen
DSS		N-Hydroxysuccinimid
SPDP		N-Hydroxysuccinimid, Pyridyldisulfid
Sulfo-SMCC		Maleinimid, Sulfo-N-hydroxysuccinimid

##### 4.4.4.1 Crosslink mit DSS

Disuccinimidyl-Suberat (DSS) ist ein homobifunktionaler und nicht-spaltbarer Crosslinker, der an beiden Enden des C<sub>8</sub>-Linkers jeweils einen Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) besitzt. NHS-Ester reagieren mit primären Aminen bei pH 7 bis pH 9 unter Ausbildung einer Amidbindung.

Der Crosslink mit DSS wurde, wie in der folgenden Tabelle 21 beschrieben, zusammen pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Crosslinker wurde durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl abreagiert.

**Tabelle 21: Crosslink mit DSS.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
12,5 $\mu$ M DSS (in DMF)	2 $\mu$ L	500 $\mu$ M
100 $\mu$ M 5'-Amino-AIR-3A	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ M
10x PBS	5 $\mu$ L	1x
87 $\mu$ M Gelonin	14 $\mu$ L	24 $\mu$ M
Aqua dest.	26,5 $\mu$ L	

#### 4.4.4.2 Crosslink mit SPDP

Bei SPDP (*N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat) handelt es sich um einen heterobifunktionalen Crosslinker. Dieser besteht aus einem NHS Ester, der über einen C<sub>3</sub>-Linker mit einer Pyridyldisulfidgruppe verbunden ist. Der NHS Ester reagiert mit primären Aminen, die Pyridyldisulfidgruppe hingegen mit Thiolen wie z. B. Cystein über eine reversible Disulfidbindung.

Gelonin wurde vor dem Crosslink für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit DTT reduziert, um die Disulfidbrücke im Gelonin für den Crosslinker zugänglich zu machen (Tabelle 22). und anschließend mittels einer *Bio-Spin Column with Bio-Gel P-6* gereinigt.

**Tabelle 22: Reduktion von Gelonin mit DTT.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
87 $\mu$ M Gelonin	20 $\mu$ L	17,4 nM
1 M DTT	1 $\mu$ L	10 mM
10x PBS	1 $\mu$ L	1x
Aqua dest.	78 $\mu$ L	

Der Crosslink erfolgte in zwei Teilschritten. Zunächst erfolgte die 30 minütige Kopplung des 5'-Amino-modifizierten Aptamers an den Crosslinker (Tabelle 23) und die Reinigung über eine *Bio-Spin Column with Bio-Gel P-6*. Im zweiten Schritt erfolgte der Crosslink mit zuvor reduziertem Gelonin. Dazu wurden 20  $\mu$ L des reduzierten Gelonins zum Aptamer-SPDP hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 23: Crosslink mit SPDP.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
100 $\mu\text{M}$ 5'-Amino-AIR-3A	2,5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{M}$
0,1 mg SPDP/mL DMF	10 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{g/mL}$
10x PBS	2,5 $\mu\text{L}$	1x
Aqua dest.	10 $\mu\text{L}$	

#### 4.4.4.3 Crosslink mit Sulfo-SMCC

Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) ist ein nicht spaltbarer Crosslinker, der aus einem NHS-Ester und einer Thiol-reaktiven Maleimidgruppe besteht. Die Maleimidgruppe reagiert mit Thiolen bei pH 6,5 bis 7,5 unter Ausbildung von stabilen Thioesterbindungen. Der Crosslink mit Sulfo-SMCC erfolgte in zwei Teilschritten. Zunächst erfolgte die 30 minütige Kopplung des 5'-Amino-modifizierten Aptamers an den Crosslinker (Tabelle 23) und die Reinigung über eine Bio-Spin Column with Bio-Gel P-6. Im zweiten Schritt erfolgte der Crosslink mit zuvor reduziertem Gelonin. Dazu wurden 20  $\mu\text{L}$  des reduzierten Gelonins zum Aptamer-SPDP hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 24: Crosslink mit Sulfo-SMCC.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
100 $\mu\text{M}$ 5'-Amino-AIR-3A	2,5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{M}$
0,1 mg Sulfo-SMCC /mL DMF	10 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{g/mL}$
10x PBS	2,5 $\mu\text{L}$	1x
Aqua dest.	10 $\mu\text{L}$	

#### 4.4.5 NACHWEIS DES CROSSLINKINGS ZWISCHEN APTAMER UND PROTEIN

Zum Nachweis der Bindung zwischen RNA und Protein wurden die zu untersuchenden Proben mit 2x SDS-Loading-Dye versetzt, erhitzt und in einem 9% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch getrennt (4.7.2). Anschließend wurde das Protein/RNA Konstrukt über das Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen (4.7.6). Danach wurde die Membran für zehn Minuten bei Raumtemperatur in NB-Waschpuffer äquilibriert und es folgte eine zweistündige Prä-Hybridisierung bei 65  $^{\circ}\text{C}$ , wozu die Membran in vorgewärmte (42  $^{\circ}\text{C}$ ) 5 mL Roti-Quick Reagenz überführt wurde, zu der anschließend 60  $\mu\text{L}$  Lachssperma-DNA hinzugefügt wurden. Es folgte die Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, deren Sequenz komplementär zur gebundenen RNA am Protein war. Die radioaktive Markierung erfolgte mit der PNK wie in 4.2.3 beschrieben und wurde anschließend nach Herstellerangaben mit einer Bio-Spin Column with Bio-Gel P-6

gereinigt. Für die Hybridisierung der Sonde wurde diese für drei Minuten bei 96 °C erhitzt und unverzüglich auf Eis abgekühlt. Die Sonde wurde zu der Membran hinzugegeben und die Hybridisierung über Nacht bei 42 °C durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Membran jeweils für 15 Minuten mit 5 mL 2x SSC 0,5% (w/v) SDS, 1x SSC 0,5% (w/v) SDS und 0,5x SSC 0,5% (w/v) SDS gewaschen und die Membran getrocknet. Als Größenstandard wurde der *prestained Protein Ladder* verwendet, der direkt auf der Membran mit radioaktiver DNA markiert wurde. Schließlich wurde die Membran in eine entsprechende Kassette mit einem Phosphoimager Screen exponiert. Der Screen wurde mit einem Phosphoimager der Firma BioRad gescannt und die Daten mit der Software *Quantity One* ausgewertet.

#### **4.4.6 KONJUGATION VON STREPTAVIDIN MIT BIOTINYLIERTEN OLIGONUCLEOTIDEN UND/ODER FLUOROPHOREN**

Zur Generierung verschiedener Biotin-Streptavidin-Konjugate wurden biotinylierte Oligonucleotide und Fluorophore verwendet. Zur Konjugation wurden die Biotintragend Komponenten gemischt und anschließend das Streptavidin hinzugegeben. Zur Bildung des Konjugats wurde der Ansatz für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In den folgenden Tabellen werden die Zusammensetzungen für die verwendete Konjugate aufgeführt.

**Tabelle 25: Streptavidin-Konjugation von Aptamer und Fluorophor.**

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
15 µM Streptavidin-Tetramer	66 µL	10 µM
100 µM 3'-Biotin-Aptamer AIR-3A	30 µL	30 µM
100 µM Atto643	10 µL	10 µM

**Tabelle 26: Streptavidin-Konjugation von siRNA-PLK1 und Aptameren.** Die Angabe der Endkonzentration bezieht sich auf die angewendete Konzentration in 100 µL Medium. Die Konjugation wurde nicht im Medium durchgeführt.

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
15 µM Streptavidin-Tetramer	1,7 µL	0,25 µM
100 µM 3'-Biotin-Aptamer AIR-3A	0,5 µL	1 µM
10 µM Biotin-siRNA-PLK1	5 µL	1 µM
	100 µL	

## 4.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 4.5.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLINIEN

Baf\_gp130- und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurden in DMEM-Medium (inkl. 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Baf\_gp130-Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit von Hyper-IL-6 (10 ng/mL), Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen hIL-6 (10 ng/ $\mu$ L) kultiviert.

Hek293, HeLa- und HepG2-Zellen wurden in DMEM-Medium (inkl. 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 bis 90% wurden die Zellen trypsiniert (4.5.2) und 1/6 in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium umgesetzt.

U937-Zellen wurden in RPMI1640-Medium (inkl. 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen, musste alle drei bis vier Tage das Medium über Zentrifugation für fünf Minuten bei 800 x g entfernt werden und durch frisches ersetzt werden.

### 4.5.2 TRYPSINIERUNG ADHÄRENT-WACHSENDER ZELLEN

Adhärenz wachsende HepG2- oder HeLa-Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA überschichtet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bis zur Ablösung der Zellen von der Kulturflasche. Bei Ablösung der Zellen wurde ein Teil der Zellen in eine neue Kulturflasche mit FKS-haltigen Medium umgesetzt.

### 4.5.3 siRNA-TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN

Zur Transfektion von U937-Zellen wurde das *Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit C* der Firma Lonza verwendet. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen für zehn Minuten bei 90 x g und Raumtemperatur pelletiert und in 100  $\mu$ L *Nucleofactor Solution* (82  $\mu$ L *Nucleofactor Solution* plus 18  $\mu$ L *Supplement*) resuspendiert. Anschließend wurden entweder 200 nM siRNA-PLK1 oder 200 nM siRNA-PLK1-Aptamer-Konjugat (5.4.2.5) hinzugegeben. Die Transfektion wurde im NucleofectorII der Firma Amaxa Biosystems unter der Verwendung des Programms W-001 durchgeführt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ L RPMI1640-Medium (10% FKS, 1% Pen/Strep) wurde der Ansatz in eine 12-Well-Platte überführt, in der bereits 1 mL RPMI1640-Medium vorlag und weiter kultiviert.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 2 µg pmaxGFP-Vektor transfiziert und nach 24 Stunden der Anteil an fluoreszierenden Zellen über eine Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **4.5.4 PROTEIN-TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN**

Die Transfektion von Zellen mit Proteinen wurde mit dem *TurboFect Protein Transfection Reagent* (Fermentas) durchgeführt. Dazu wurden  $2 \times 10^4$  Suspensionszellen bzw.  $1 \times 10^4$  adhärent wachende Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Zum Protein (0,25 µg in 20 µL serumfreien Medium) wurden 0,5 µL *Enhancer* und 0,5 µL Protein-Transfektionsreagenz hinzugegeben, gemischt und 15 - 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen in 500 µL serumfreien Medium aufgenommen, wobei die Suspensionszellen bei  $200 \times g$  für 5 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 20 µL des TurboFect/Protein-Komplexes tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden jeweils 200 µL serumhaltiges Medium hinzugegeben.

#### **4.5.5 PROLIFERATIONSTEST**

Die Proliferation von Zellen wurde mittels des *AlarmaBlue Cell Viability Reagent* nachgewiesen. Proliferationstests wurden in 96-Well-Platten durchgeführt. Dabei wurden mindestens  $1 \times 10^4$  adhärent wachsende Zellen (HeLa, HepG2) bzw. mindestens  $4 \times 10^5$  Suspensionszellen (Baf\_gp130 und Baf\_gp130\_hIL-6R) mit 10% *AlarmaBlue*-Reagenz für vier Stunden lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert und anschließend vermessen. Produkte von oxidativen Prozessen in der Zelle (z. B. Zellatmung) reduzierten den Indikatorfarbstoff AlarmaBlue. Das reduzierte *AlarmaBlue* konnte über die Absorption bei 570 und 600 nm oder über Fluoreszenz nachgewiesen werden (Anregung 530 – 560 nm und Emission 590 nm). Für einen gezielten Zelltod wurden die zu untersuchenden Zellen mit 10 µg Cycloheximid pro mL Medium versetzt.

#### **4.5.6 STIMULATION VON ZIELZELLEN DURCH APTAMERBINDUNG**

Zur Untersuchung von Baf\_gp130- oder Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurden diese fünfmal mit Medium gewaschen, um die Zytokine Hyper-IL-6 bzw. hIL-6 zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend über Nacht mit dem Zytokin IL-3 inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit FKS-freiem Medium gewaschen und  $5 \times 10^5$  Zellen in

500  $\mu\text{L}$  FKS-freiem Medium mit IL-3 aufgenommen. Zu diesen Zellen wurden 200 nM bis 1  $\mu\text{M}$  Aptamer hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  wurden 50  $\mu\text{L}$  FKS hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen stimuliert mit IL-3 und hIL-6. Am folgenden Tag wurden die Zellen pelletiert und in 100  $\mu\text{L}$  3x SDS-Loading-Dye aufgenommen. Die Zellstimulation erfolgte über einen immunologischen Nachweis von phosphorylierten STAT3. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Aktin. Zytokin unabhängige Zellen wurden direkt mit serumfreien Medium gewaschen und mit dem entsprechenden Aptamer (wie oben beschrieben) inkubiert.

## **4.6 UNTERSUCHUNG VON APTAMER-TARGET-INTERAKTIONEN**

### **4.6.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE**

In der Durchflusszytometrie werden suspendierte Einzelzellen an einem fokussierten Laser vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Färbung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren gemessen werden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit dem FACSCalibur System der Firma Becton Dickinson *Immunocytometry Systems* durchgeführt. Das FACSCalibur verfügt über einen 15 mW 488 nm luftgekühlten Argon-Ionen Laser, mit dem es möglich war, über den FL-1 Detektor FITC und Atto488 zu detektieren. Ein weiterer 635 nm Rot-Dioden-Laser ermöglichte die Detektion (FL-4 Detektor) von APC und Atto647.

#### **4.6.1.1 Immunologischer Nachweis von Rezeptoren auf Zelloberflächen**

Der Nachweis von Rezeptoren auf der Zelloberfläche erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen bei 800 x g für fünf Minuten und 4 °C zentrifugiert und in 500  $\mu\text{L}$  Selektionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 800 x g für fünf Minuten gewaschen und die Zellen in 350  $\mu\text{L}$  Selektionspuffer aufgenommen (Waschschritt). 1  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Antikörpers wurde für eine halbe Stunde hinzugegeben und die Zellen auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 350  $\mu\text{L}$  Selektionspuffer resuspendiert. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper, der ebenfalls für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert wurde, wonach nochmals für fünf Minuten und

800 x g zentrifugiert wurde. Die Zellen wurden wiederum in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen.

#### **4.6.1.2 Bindung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Zelloberflächen**

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Bindung von Aptameren an Zelloberflächen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit Selektionspuffer gewaschen und in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen. Die fluoreszenzmarkierten Aptamere (0,3 - 3 µM) wurden zu den Zellen gegeben und bei 37 °C oder auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen pelletiert und in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen und vermessen.

#### **4.6.1.3 Internalisierung von fluoreszenzmarkierten Aptameren**

Die Internalisierung wurde durch Temperaturerhöhung auf 37 °C induziert. Zur Unterscheidung zwischen internalisierten und an der Zelloberfläche gebundenen Aptameren wurden die Zellen nach Inkubation mit dem Aptamer in Selektionspuffer gewaschen und in für 5 Minuten und 37 °C in 350 µL Trypsin/EDTA aufgenommen oder mit RNase behandelt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen.

### **4.6.2 FLUORESZENZMIKROSKOPIE**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden an einem LSM 510 ConfoCor2 mit einem C-Apochromat 40x Objektiv (Numerische Appertur 1,2; Wasserimmersion) der Firma Carl Zeiss (Jena) aufgenommen. Dafür wurden die Zielzellen auf ein 24 x 50 mm dünnes Deckglas (Brand) pipettiert. Zur Detektion von Atto647N wurde ein HeNe-Laser (633 nm) mit einer Intensität von 10% und 25 mW verwendet. Der Halbfarbbeiler wurde auf 547/633 nm eingestellt und der *Longpass* 650 verwendet.

## **4.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN**

### **4.7.1 PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE IN *E. COLI***

Zur Produktion der fluoreszierenden Proteine mCherry und mRFP1 wurden *E. coli* BL21 Zellen mit pRESTmCherry bzw. pRSETmRFP1 transformiert und in 10 mL LB-Medium (Roth) mit 50 µg Ampicillin pro mL über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurde 1 L LB-Medium mit 50 µg Ampicillin/mL und 5 mL der Über-Nacht-Kultur

beimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7 angezogen. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Zellen wurden weitere drei Stunden kultiviert, im Anschluss pelletiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.7.2 PROTEINREINIGUNG

Zur Proteinreinigung wurde 1 L Proteinexpressionskultur pelletiert und in 20 mL Bindepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einem *Branson Sonifier* 250A auf Eis sonifiziert (*Output Control* 3, *Duty Cycle* 30, 5 x 3 min) und für eine Stunde bei 11.000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Lysat wurde über einen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Sterilfilter gegeben und über eine ÄKTApurifier der Firma GE Healthcare unter Verwendung einer *HisTalon-Cartridge*-Säule affinitätschromatographisch gereinigt. Die Säule, die Proteine mit einem His-Tag über Kobalt koordiniert, wurde mit 5 mL Bindepuffer äquilibriert und das Lysat mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule gegeben. Danach folgte ein Waschschrift von fünf Säulenvolumen mit Bindepuffer und eine *One-Step* Elution mit Imidazol (Elutionspuffer). Die Fraktionierung der nicht gebundenen Proteine sowie der Waschschriffe und Elutionsfraktionen erfolgte in 1 mL *Aliquots*. Die resultierenden Proteinfractionen wurden gelelektrophoretisch getrennt und über Western-Blot analysiert.

#### 4.7.3 GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON PROTEINEN

Die Trennung von Proteinen erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen (Tabelle 27) elektrophoretisch bei 200 V und 30 mA pro Gel in 1 x SDS-Laufpuffer. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit 3x SDS-*Loading-Dye* versetzt und für fünf Minuten bei  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Als Größenstandard dienten die *Unstained* und *Prestained Protein Ladder*.

Tabelle 27: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen.

Komponenten	9% PAA-Gele	15% PAA-Gele
4x Trenngelpuffer	1 x	1 x
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1	9%	15%
TEMED	0,07%	0,07%
APS	0,07%	0,07%

#### 4.7.4 COOMASSIEFÄRBUNG

Zur Proteinfärbung mit Coomassie wurde das zu untersuchende Proteingel für eine Stunde oder über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Um überschüssiges

Coomassie zu entfernen, wurde das Gel anschließend entfärbt (Coomassie-Entfärbelösung, Tabelle 4).

#### **4.7.5 SILBERFÄRBUNG**

Zur Detektion von geringen Proteinmengen wurde eine Silberfärbung angewandt. Das zu untersuchende Proteingel wurde dazu zunächst für eine Stunde in frisch angesetzter Fixierlösung inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel für eine Stunde oder über Nacht in Inkubationslösung gelegt, folgend 3x für zehn Minuten mit Wasser gewaschen und zum Färben für 30 Minuten in Färbelösung inkubiert. Die Proteinbanden wurden nach Zugabe der Entwicklerlösung sichtbar. Um ein Nachdunkeln der Banden zu verhindern, wurde abschließend das Gel in Stopplösung gelegt (Lösungen: Tabelle 4).

#### **4.7.6 WESTERN-BLOT-ANALYSE**

Zur Western-Blot-Analyse wurden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine in einem Nassblotverfahren auf eine PVDF Membran übertragen. Die PVDF-Membran (Roth) wurde in Methanol aktiviert, mit Wasser gespült und in CAPS-Puffer äquilibriert. Die aktivierte Membran wurde auf zwei in CAPS-Puffer getränkte Filterpapiere (Roth) gelegt, das Proteingel luftblasenfrei auf diese Membran platziert und mit zwei weiteren Filterpapieren belegt. Das Ganze wurde in eine entsprechende Kassette gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde in einem *TE 22 Mini Transfer Tank* (BioRad) in CAPS-Puffer bei 50 V. Für die anschließende Immundetektion wurde die Membran in 1x TBS gewaschen und für eine Stunde bis über Nacht mit 20 mL Blockpuffer blockiert. Die entsprechenden Antikörper (Tabelle 9) wurden in Blockpuffer verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran jeweils für 10 min mit 1x TBS und Reaktionspuffer gewaschen. Die Farbreaktion fand in 1/100 BCIP und 1/10 NBT in Reaktionspuffer statt.

#### **4.7.7 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION**

Die Proteinkonzentration wurde mittels *BCA Assay (Protein Quantification Kit)* bestimmt. Dazu wurde mit einer BSA-Eichreihe von 1 mg/mL bis 0,03 mg/mL angefertigt. Jeweils 25 µL der zu untersuchenden Proteinlösung, des Standards sowie des Puffers in dem sich das Protein befand, wurden mit 200 µL *BC Assay* Reagenz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 562 nm vermessen.

## 4.8 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Das Fluoreszenzspektroskop *Cary Eclipse* der Firma Varian diente zur Erstellung von dreidimensionalen Spektren von fluoreszierenden Proteinen.

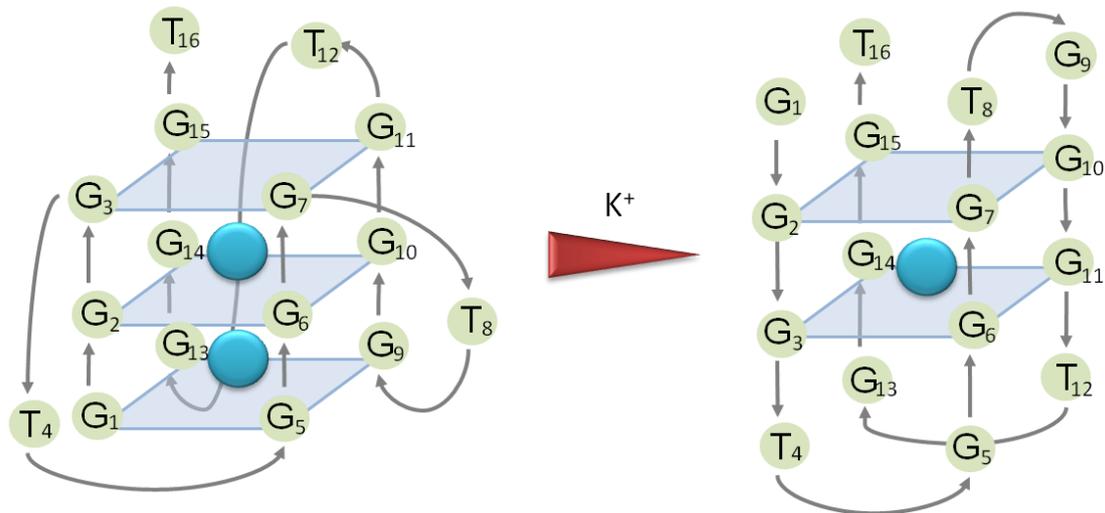
## 5. ERGEBNISSE

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung zweier Aptamere, die spezifisch sowie mit hoher Affinität an den humanen Interleukin-6-Rezeptor binden. Die Aptamere wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ulrich Hahn selektiert.

### 5.1 CHARAKTERISIERUNG VON IL-6-REZEPTOR-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMEREN

Das DNA-Aptamer AID-1, welches affin den humanen IL-6-Rezeptor bindet, wurde bezüglich seiner strukturellen Eigenschaften hin untersucht. Wichtig war es dabei, die Frage zu klären, welche Basen zur Stabilität und zur Ausbildung der Quadruplex-Struktur notwendig sind und durch welchen Basen-Austausch die Fähigkeit verloren geht, das Zielmolekül Hyper-IL-6 zu binden. Das AID-1-Aptamer weist die Sequenz (GGGT)<sub>4</sub> auf, welche zuvor als bindendes DNA-Molekül identifiziert wurde, mit der HIV-1-Integrase interagiert und bereits gut charakterisiert wurde [59, 60]. Abhängig von der K<sup>+</sup>-Ionenkonzentration werden zwei mögliche Quadruplex-Strukturen postuliert. Eine intrinsisch anti-parallele Konformation wurde über NMR bestimmt, die bevorzugt bei geringen K<sup>+</sup>-Ionenkonzentrationen vorliegt [89]. Bei höheren K<sup>+</sup>-Ionenkonzentrationen liegt eine parallele Konformation vor, die über CD-Spektroskopie und ESI-MS (Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie) nachgewiesen werden konnte [58, 59]. In Abbildung 11 ist eine schematische Darstellung der beiden Quadruplex-Strukturen gezeigt, in der jeweils vier Guanin-Basen eine Tetrade ausbilden (G-Tetrade). Die Stabilität des Quadruplexes wird durch Komplexierung von monovalenten Kationen gewährleistet, die sich jeweils zwischen den Tetraden befinden.

In früheren Arbeiten wurden Varianten des AID-1-Aptamers untersucht (siehe Tabelle 28, [58]), in die ausgehend vom DNA-Aptamer AID-1 eine Mutation eingebaut wurde. Ein Teil dieser Varianten wurden in Filterretentionsstudien auf eine Interaktion mit Hyper-IL-6 untersucht. Hyper-IL-6 ist ein Designer Zytokin, bestehend aus dem löslichen IL-6-Rezeptor und dem Zytokin IL-6. Ein um den Thyminrest an Position 16 verkürztes Aptamer (AID-1-T) wies im Vergleich zum AID-1-Aptamer eine höhere Affinität zu Hyper-IL-6 auf. In einer weiteren Variante des IL-6R-bindenden DNA- Aptamers AID-1 wurde eine Guanin-Base der mittleren G-Tetrade gegen eine Thymin- Base ausgetauscht



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der postulierten Quadruplex-Strukturen des DNA-Aptamers AID-1 [59].** Je vier Guanin-Basen bilden eine Tetrade, welche ein monovalentes Kation komplexieren (blau). Abhängig von der  $K^+$ -Ionenkonzentration nimmt das Aptamer eine parallele (links) oder anti-parallele (rechts) Konformation ein.  $G_1$  stellt das 5'- und  $T_{16}$  das 3'-Ende des DNA-Stranges dar. T = Thymin; G = Guanin; Tiefgestellte Ziffern kennzeichnen die Position im DNA-Strang.

(Tabelle 28 und Abbildung 11). AID-1-G6T wurde dabei als nicht bindende Variante des AID-1-Aptamers identifiziert [58].

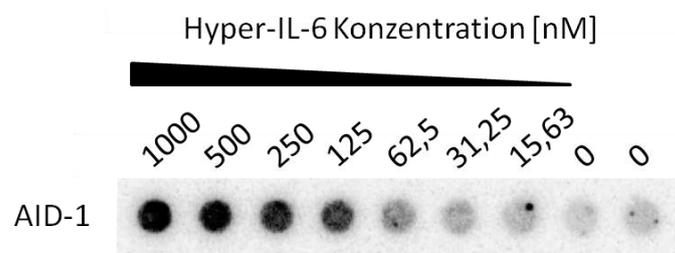
Zu Beginn dieser Arbeit wurden zur Verifizierung der Ergebnisse der vorherigen Arbeiten Filterretentionsstudien der Aptamere AID-1, AID-1-T und AID-1-G6T wiederholt. Zusätzlich wurden die Varianten G2T, G10T und G14T des AID-1-Aptamers auf die Fähigkeit hin untersucht, Hyper-IL-6 zu binden, um herauszufinden, ob jeder Austausch einer Guanin-Base der mittleren Tetrade zu einem Bindungsverlust führt.

**Tabelle 28: Varianten des DNA-Aptamers AID-1, deren Interaktion mit Hyper-IL-6 verifiziert werden sollte.** Ausgehend vom IL-6R-bindenden DNA-Aptamer AID-1 wurden Varianten erzeugt, bei denen Basen entfernt (AID-1-T) oder ausgetauscht wurden (rot).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AID-1	d(GGGTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-T	d(GGGTGGGTGGGTGGG-)
AID-1-G2T	d(G <b>T</b> GTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-G6T	d(GGGT <b>T</b> GTGGGTGGGT)
AID-1-G10T	d(GGGTGGGT <b>T</b> GTGGGT)
AID-1-G14T	d(GGGTGGGTGGGT <b>T</b> GT)

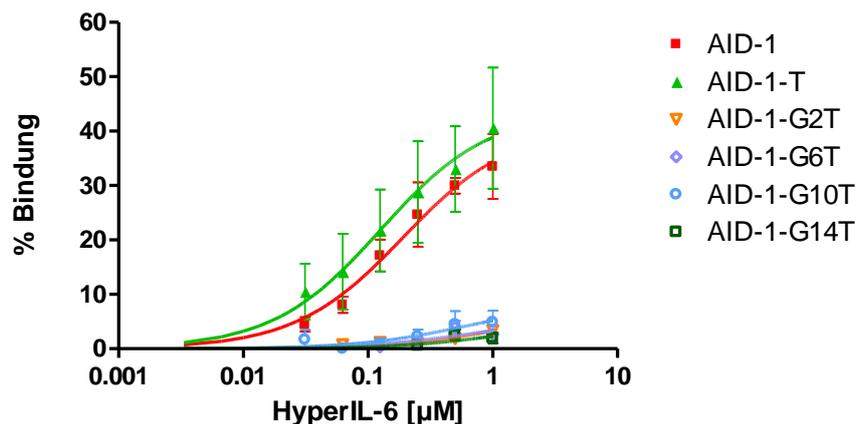
### 5.1.1 ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN HIL-6R-BINDENDEN DNA-APTAMEREN UND HYPER-IL-6

Zur Analyse der Interaktion zwischen dem DNA-Aptamer AID-1 bzw. davon abgeleiteten Varianten und Hyper-IL-6 wurden Filterretentionsstudien durchgeführt. Dazu war es notwendig, die zu untersuchenden Nucleinsäuren radioaktiv zu markieren. Nach Inkubation der radioaktiv-markierten Aptamere mit steigenden Mengen an Hyper-IL-6 wurden Filterbindungstests durchgeführt. In Abbildung 12 ist exemplarisch ein Filterbindungstest zur Analyse der Interaktion zwischen dem DNA-Aptamer AID-1 und Hyper-IL-6 dargestellt. Je intensiver die Schwarzfärbung der Punkte ist, desto mehr radioaktiv-markierte DNA wurde vom Protein gebunden. Es ist deutlich eine konzentrationsabhängige Bindung zwischen dem Aptamer AID-1 und Hyper-IL-6 zu sehen.



**Abbildung 12: Filterbindungstest zur Analyse der Interaktion zwischen dem AID-1-DNA-Aptamer und Hyper-IL-6.** Radioaktiv markierte AID-1-DNA wurde mit steigenden Konzentrationen an Hyper-IL-6 (0 - 1  $\mu$ M) inkubiert und durch eine Nitrozellulosemembran filtriert. Verbleibende Radioaktivität auf dem Filter wurde autoradiographisch detektiert und analysiert.

Folgend wurden neben AID-1 und AID-1-T alle Varianten der mittleren G-Tetrade (G2T, G6T, G10T und G14T) in Filterbindungstests auf eine Bindung an Hyper-IL-6 untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der GraphPad Prism Software und ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt, wobei die Hyper-IL-6-Konzentration gegen die prozentualen Bindungen der jeweiligen DNAs an das Protein aufgetragen wurden. Der Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass sowohl AID-1 als auch AID-1-T, jedoch keine der untersuchten Varianten des DNA-Aptamers an Hyper-IL-6 gebunden haben. Dies ist daran zu erkennen, dass bei steigenden Hyper-IL-6-Konzentrationen der prozentuale Anteil des gebundenen Aptamers mit zunehmenden Proteinmengen zunimmt. Anhand dieser Resultate konnten die Dissoziationskonstanten bestimmt werden, die für AID-1 mit 0,19  $\mu$ M und für AID-1-T mit 0,13  $\mu$ M in der gleichen Größenordnung lagen, wie bereits von Frau Dr. Zivkovic bestimmt [58]. In Tabelle 29 sind die resultierenden Dissoziationskonstanten zusammengefasst.



**Abbildung 13: Graphische Auswertung des Filterbindungstests zur Analyse der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und dem DNA-Aptamer AID-1 bzw. den davon abgeleiteten Varianten.** Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil des gebundenen DNA-Aptamers in Abhängigkeit der Hyper-IL-6-Konzentration (0 – 1  $\mu\text{M}$ ) halblogarithmisch aufgetragen unter Verwendung der Software GraphPad Prism. Die gezeigten Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten generiert.

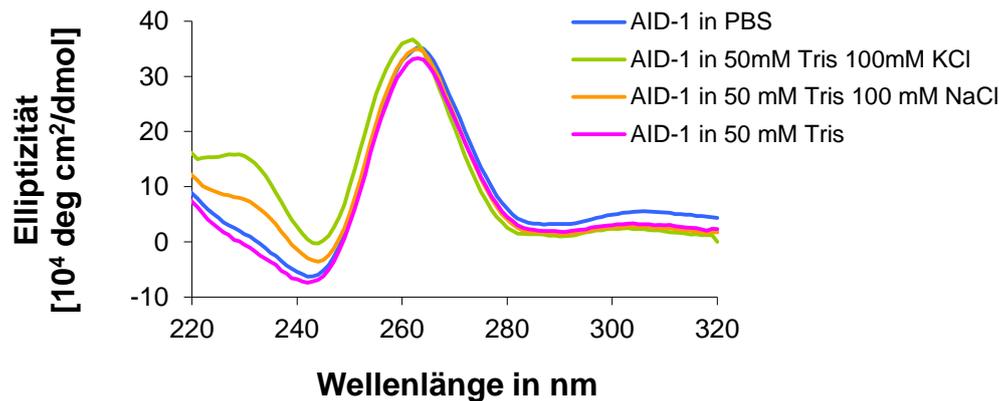
**Tabelle 29: Übersicht der Dissoziationskonstanten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und dem DNA-Aptamer AID-1 und den davon abgeleitete Varianten.**

	AID-1	AID-1-T	AID-1-G2T	AID-1-G6T	AID-1-G10T	AID-1-G14T
$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	$0,19 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,07$	$1,49 \pm 1,56$	$0,65 \pm 0,65$	$0,61 \pm 0,84$	$1,48 \pm 3,81$
$B_{max}$ [%]	$41,0 \pm 5,0$	$43,8 \pm 8,5$	$8,3 \pm 5,8$	$5,5 \pm 2,9$	$8,4 \pm 5,9$	$5,7 \pm 10,0$

Letztendlich bewirkte der Austausch einer der Guanin-Basen gegen eine Thymin-Base in der mittleren Tetrade des DNA-Aptamers AID-1 den kompletten Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Hyper-IL-6.

#### 5.1.1.1 Auswirkung des Basen-Austausches auf die Quadruplex-Struktur des IL-6R-bindenden AID-1-Aptamers

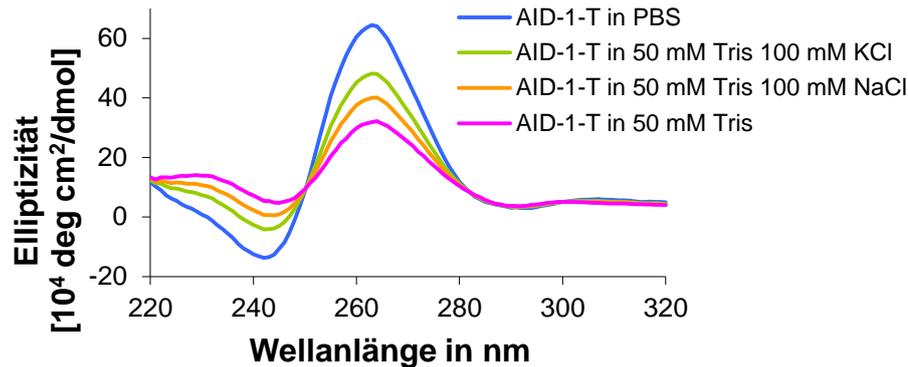
Guanin-Basen, die an der Ausbildung der mittleren G-Tetraden bzw. Quadruplex-Struktur beteiligt waren, wurden ausgetauscht. Ob das Einfügen der Mutationen die Ausbildung der Quadruplex-Struktur beeinflusste, wurde über Zirkulardichroismus (CD) Spektroskopie untersucht. Aufgrund der optischen Aktivität wird links und rechts polarisiertes Licht absorbiert. Deren Differenz kann als Funktion der Wellenlänge dargestellt werden. Dabei resultieren für Quadruplexe charakteristische Kurvenverläufe. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der spektroskopischen CD-Messung von AID-1 zu sehen.



**Abbildung 14: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des DNA-Aptamers AID-1 in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems.** Die DNA-Lösungen (5  $\mu\text{M}$ ) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

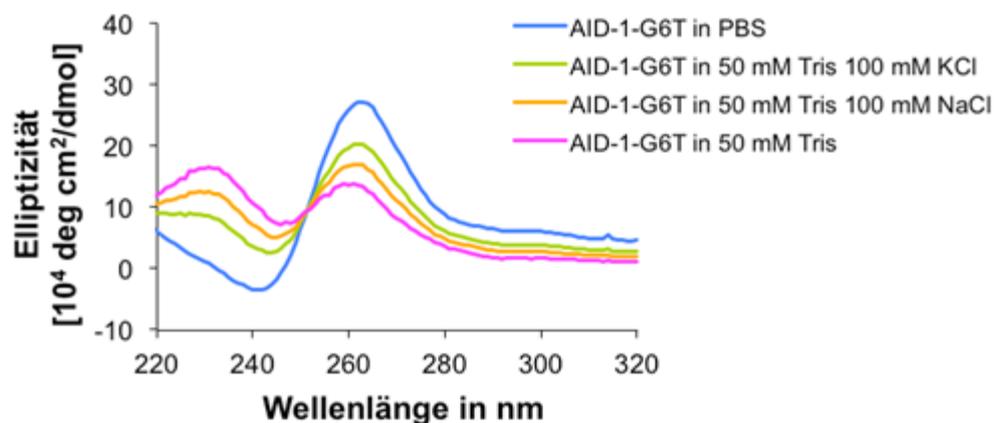
Der Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die Kurven jeweils ein Minimum bei 240 nm und Maximum bei 264 nm zeigten, die typisch für G-Quadruplexe einer parallelen Konformation sind. D. h., dass die DNA-Stränge innerhalb des Quadruplexes parallel zueinander orientiert vorliegen (Vgl. Abbildung 11). Quadruplexe koordinieren monovalente Kationen zwischen benachbarten G-Tetraden, so auch das AID-1-Aptamer. Die spektroskopische Untersuchung in Abwesenheit von monovalenten Kationen zeigte jedoch keinen Unterschied zu den anderen Messungen, in denen Kationen vorhanden waren.

Die AID-1-Varianten wurden ebenfalls CD-spektroskopisch unter verschiedenen Pufferbedingungen vermessen. In Abbildung 15 ist das Ergebnis der CD-Messung von AID-1-T dargestellt. Das Aptamer enthielt im Gegensatz zum AID-1-Aptamer am 3'-Ende eine Thymin-Base weniger und wies im Vergleich zu AID-1 eine höhere Affinität zu Hyper-IL-6 auf. Beim Vergleich der CD-Messungen von AID-1 und AID-1-T war erkennbar, dass AID-1-T in PBS ein größeres Maximum bei 264 nm aufwies, was unter den gemessenen Bedingungen auf eine stabilere Struktur hindeutete. Der weitere Vergleich der Messungen in den anderen Puffern untereinander zeigte, dass die Struktur von AID-1-T in Anwesenheit von Kalium- oder Natrium-Ionen noch stabil war und in Abwesenheit monovalenter Ionen (Tris-Puffer) am wenigsten stabil zu sein schien.



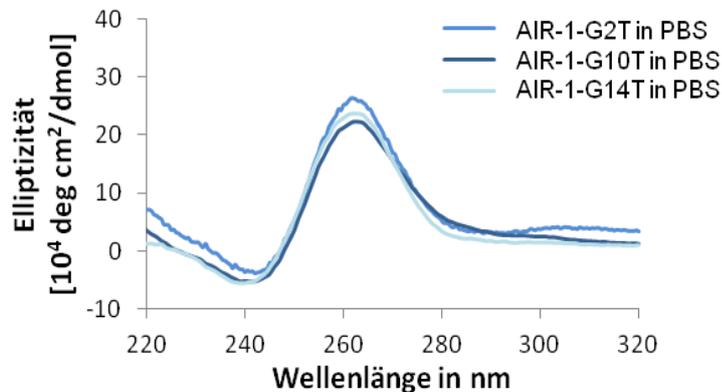
**Abbildung 15:** CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AID-1-DNA-Aptamer-Variante AID-1-T in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems. Die DNA-Lösungen ( $5 \mu\text{M}$ ) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Bei den anderen AID-1-Varianten wurde jeweils eine Guanin-Base der mittleren Tetrade gegen eine Thymin-Base ausgetauscht. Exemplarisch wurde lediglich AID-1-G6T in allen Puffern CD-spektroskopisch vermessen und zu sehen war, dass AID-1-G6T nur im PBS-Puffer das Quadruplex-typische Minimum und Maximum aufwies und in allen anderen Puffern nicht (Abbildung 16). Zudem ist die maximale Elliptizität bei ca. 260 nm geringer als bei AID-1-T und AID-1 (Abbildung 14 und Abbildung 15). Diese Variante bildet demnach nur in PBS-Puffer eine Quadruplex-Struktur aus, die nicht so stabil wie das ursprüngliche Aptamer ist.



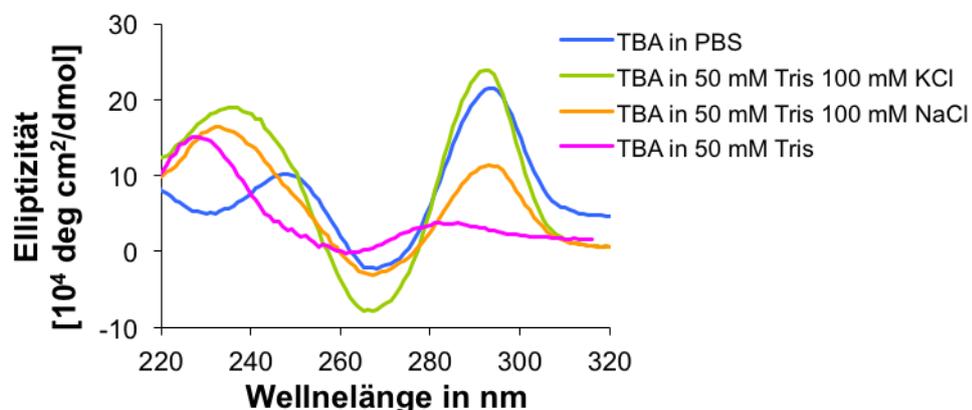
**Abbildung 16:** CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AID-1-DNA-Aptamer-Variante AID-1-G6T in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems. Die DNA-Lösungen ( $5 \mu\text{M}$ ) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Die AID-1-Varianten G2T, G10T und G14T wurden lediglich in PBS CD-spektroskopisch vermessen und wiesen jeweils das für Quadruplexe typische Minimum und Maximum auf, wobei diese weniger ausgeprägt waren als beim AID-1- oder AID-1-T-Aptamer (Abbildung 17).



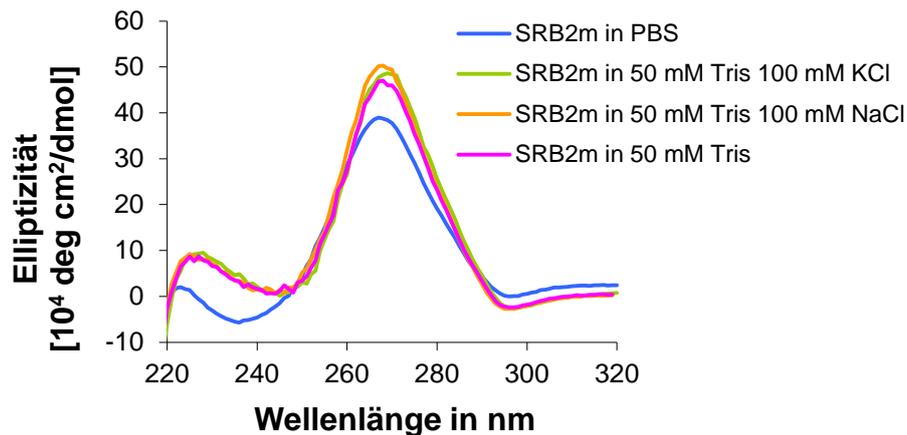
**Abbildung 17:** CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AID-1-DNA-Aptamer-Varianten AID-1-G2T, G10T und G14T in PBS-Puffer. Die DNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in PBS-Puffer spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Zur Verifizierung der CD-Messungen wurden zusätzlich das RNA-Aptamer SRB2m, welches keine Quadruplex-Struktur aufweisen sollte, und das Thrombin-bindende DNA-Aptamer TBA, welches eine anti-parallele Anordnung des G-Quadruplexes annimmt, untersucht. Das Thrombin-bindende DNA-Aptamer (TBA) ist ein gut untersuchtes Aptamer mit der Sequenz: 5'-dGGTTGGTGTGGTTGG-3' [90]. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der CD-Messung abgebildet. Die graphische Auswertung der Ergebnisse der CD-Messungen (Abbildung 18) zeigte die für einen anti-parallel angeordneten Quadruplex-typischen Kurvenverlauf (neg. Minimum bei 265 nm, pos. Maximum bei 295 nm).



**Abbildung 18:** CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des Thrombin-bindenden Aptamers (TBA) in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems. Die DNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Das Sulforhodamin-B-bindende RNA-Aptamer SRB2m weist mit der Sequenz 5'-GGAACCUCGCUUCGGCGAUGAUGGAGAGGCGCAAGGUUAACCGCCUCAGGUUCC-3' keine durch Guanin stabilisierte Quadruplex-Struktur auf und wurde als Negativkontrolle heran gezogen. Bei näherer Betrachtung der Elliptizitätskurven von SRB2m (Abbildung 19) fehlen die Quadruplex-charakteristischen negativen und positiven Maxima bei 264 nm bzw. Minima bei 240 nm. Zudem führt die Abwesenheit von monovalenten Ionen zu keiner Veränderung der Elliptizitätskurve.



**Abbildung 19: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des Sulforhodamin-B-bindenden Aptamers SRB2m in Abhängigkeit vom gewählten Puffersystem.** Die DNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

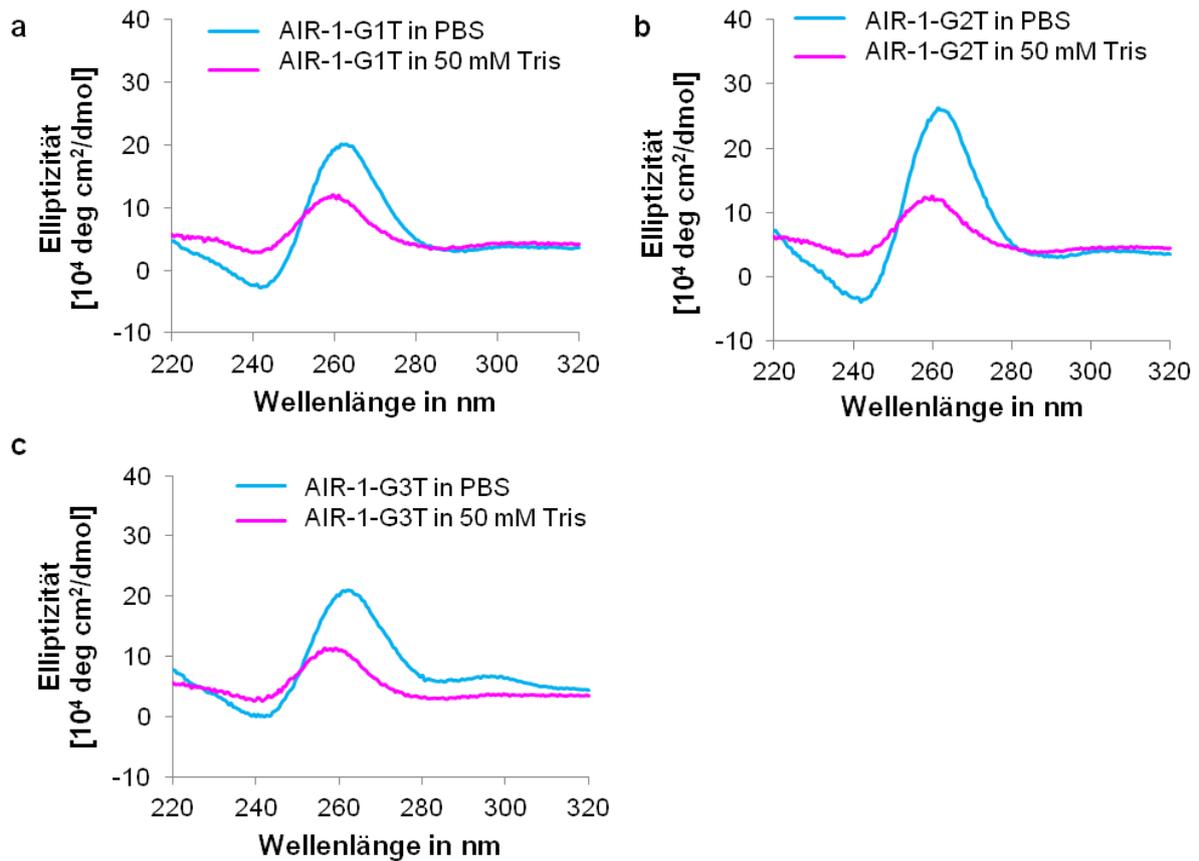
Vom AID-1-DNA-Aptamer wurden Varianten untersucht (Tabelle 28), in denen der Austausch eines Desoxyguanidins der mittleren Tetrade gegen eine Thymin-Base vorgenommen wurde. Filterretentionsstudien zeigten, dass diese Aptamer-Varianten nicht mehr in der Lage waren, den humanen IL-6-Rezeptor zu binden. Dennoch haben CD-spektroskopische Untersuchungen ergeben, dass die Quadruplex-typischen Kurvenverläufe nicht durch den Austausch von einer Guanin-Base gegen Thymin zum Verlust des Kurvenverlaufs führten. Im Folgenden wurden weitere Varianten des AID-1-Aptamers untersucht (siehe Tabelle 33), um einerseits mehr über die Stabilität des Quadruplexes herauszufinden und andererseits, um die mit dem humanen IL-6-Rezeptor interagierenden Basen zu identifizieren.

**Tabelle 30: Weitere Varianten des DNA-Aptamers AID-1, deren Interaktion mit Hyper-IL-6 analysiert wurden und die Quadruplex-Struktur bestimmt wurde.** Ausgehend vom IL-6R-bindenden DNA-Aptamer AID-1 wurden Varianten erzeugt, bei denen Basen ausgetauscht wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AID-1	d(GGGTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-G1T	d(TGGTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-G2T	d(GTGTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-G3T	d(GGTTGGGTGGGTGGGT)
AID-1-G6A	d(GGGTGAAGTGGGTGGGT)
AID-1-G6/14A	d(GGGTGAAGTGGGTGAAGT)
G1PolyGT	d(GTGTGTGTGTGTGTGTGT)
G1NK3	d(GTTTGTGTTTGTGTGT)

Zunächst wurden die Quadruplex-Strukturen von AID-1-Aptamer-Varianten betrachtet, in denen jeweils eine Guanin-Base der oberen, mittleren und unteren Tetrade gegen eine Thymin-Base ausgetauscht wurde (Tabelle 30). Der Vergleich dieser Varianten untereinander sollte Aufschluss darüber geben, ob der Basen-Austausch in den jeweiligen Tetraden dieselben Auswirkungen auf die Quadruplex-Struktur hat. Dazu wurden die AID-1-Aptamer-Varianten G1T, G2T und G3T CD-spektroskopisch in PBS- und Tris-Puffer gemessen (Abbildung 20), um zugleich die Stabilität des Quadruplexes in An- und Abwesenheit monovalenter Kationen zu untersuchen.

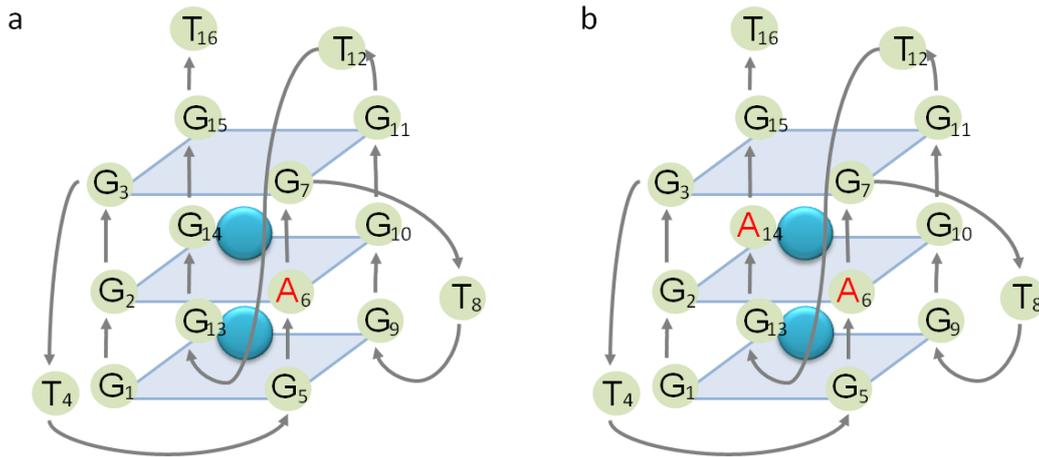
Bei Betrachtung der CD-Messungen in PBS ist zu erkennen, dass alle drei untersuchten AID-1-Varianten für Quadruplexe typische Kurvenverläufe aufwiesen. Dies wurde am Quadruplex-typischen negativen Minimum bei 240 nm und positiven Maximum bei 264 nm deutlich.



**Abbildung 20:** CD-spektroskopische Untersuchungen der AID-1-Aptamer-Varianten AID-1-G1T (a), G2T (b) und G3T (c) zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen in Abhängigkeit vom gewählten Puffersystem. Die DNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in PBS- und Tris- Puffer spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

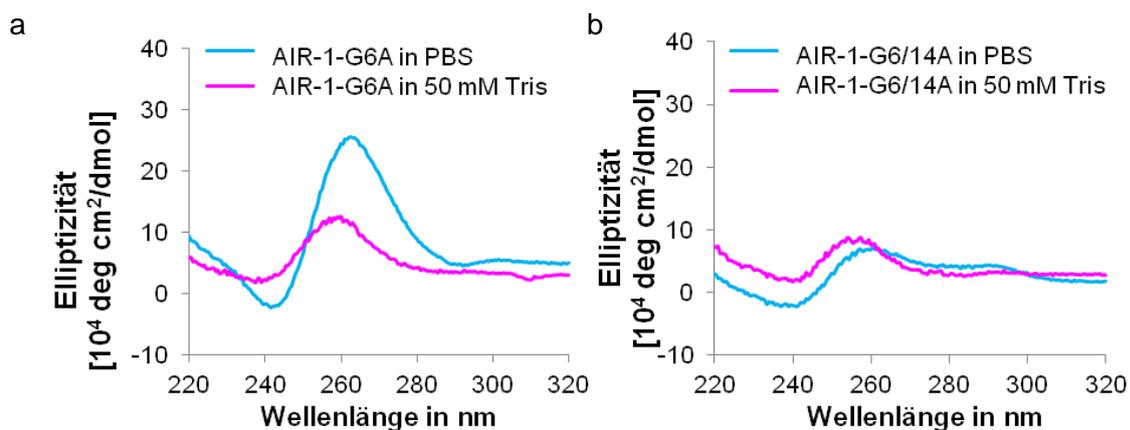
Beim Vergleich der Elliptizitätsmaxima bei 264 nm war erkennbar, dass die AID-1-G2T-Variante das größte Maximum aufwies (Abbildung 20b). Die CD-Untersuchungen in Tris-Puffer zeigten für alle drei Varianten keine Quadruplex-typischen Elliptizitätskurven.

Bei den zwei Varianten G6A und G6/14A des AID-1-Aptamers wurde zum einen eine Guanin-Base der mittleren Tetrade gegen eine Adenin-Base (AID-1-G6A), zum anderen zusätzlich eine zweite Guanin-Base derselben Tetrade ebenfalls gegen eine Adenin-Base ausgetauscht (AID-1-G6/14A, Tabelle 30 und Abbildung 21).

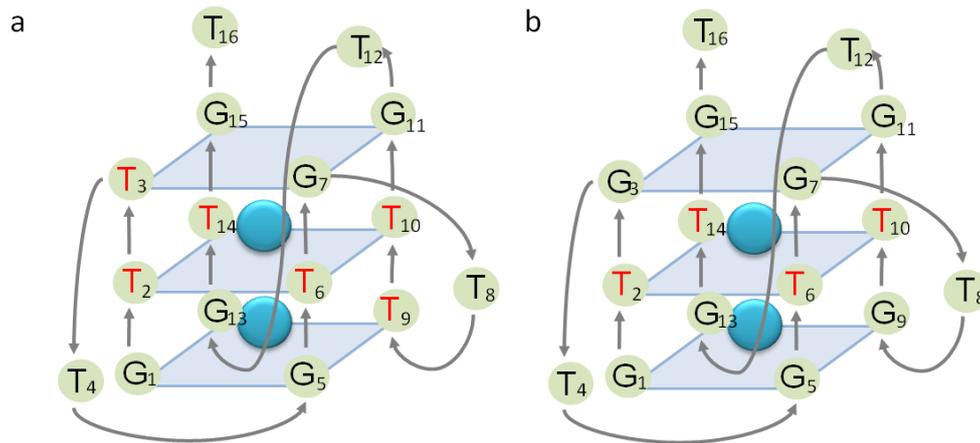


**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Quadruplex-Struktur der AID-1-Aptamer-Varianten AID-1-G6A (a) und AID-1-G6/14A (b).** Die Darstellung basiert auf der Struktur des AID-1-Aptamers in dem je vier Guanin-Basen eine Tetrade bilden. AID-1 ist charakterisiert durch drei gestapelte G-Tetraden, wobei zwischen zwei Triaden je ein monovalentes Kation (türkis) koordiniert wird. G<sub>1</sub> stellt das 5'- und T<sub>16</sub> das 3'-Ende des DNA-Stranges dar. Es handelt sich um eine parallele Anordnung der Stränge. T = Thymin; G = Guanin; A = Adenin; Tiefgestellte Ziffern kennzeichnen die Position im DNA-Strang.

Die AID-1-Varianten G6A und G6/14A wurden ebenfalls CD-spektroskopisch untersucht (Abbildung 22). Die Variante G6A wies in PBS einen für die parallele Konformation typischen Kurvenverlauf auf, welcher in Tris-Puffer kaum ausgeprägt war (Abbildung 22a). Die Variante G6/14A in der zwei Basen gegen Adenin-Basen ausgetauscht wurden, wies in PBS ein sehr geringes Elliptizitäts-Maximum auf (Abbildung 22b). Dennoch zeigte die Kurve einen für Quadruplexe typischen Verlauf an. Alle AID-1-Varianten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Björn Hansen (Universität Hamburg) untersucht.

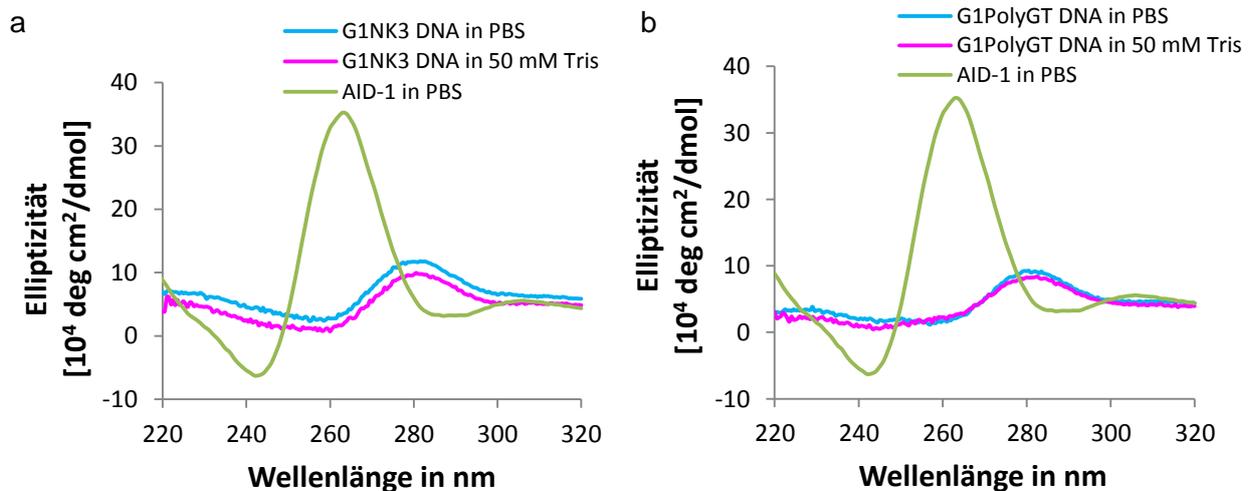


**Abbildung 22: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AID-1-Aptamer-Varianten AID-1-G6A (a) und G6/14A (b) in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems.** Die DNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in PBS- und Tris- Puffer spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Quadruplex-Struktur der AID-1-Aptamer-Varianten G1NK3 (a) und G1PolyGT (b).** Die Darstellung basiert auf der Struktur des AID-1-Aptamers in dem je vier Guanin-Basen eine Tetrade bilden. AID-1 bildet drei G-Tetraden aus, die zwischen zwei Triaden je ein monovalentes Kation (türkis) komplexieren. G<sub>1</sub> stellt das 5'- und T<sub>16</sub> das 3'-Ende des DNA-Stranges dar. Es handelt sich um eine parallele Anordnung der Stränge. T = Thymin; G = Guanin; Tiefgestellte Ziffern kennzeichnen die Position im DNA-Strang.

Im Rahmen seiner Masterarbeit wurden über computergestützte Simulationsberechnungen die AID-1-Varianten auf die Ausbildung der Quadruplex-Struktur untersucht [91]. Herr Hansen ermittelte zum einen eine aus Guanin- und Thymin-Basen alternierende DNA, die im Vergleich zum AID-1-Aptamer in der mittleren Tetrade nur Thymin-Basen aufwies und dennoch eine Quadruplex-Struktur ausbilden sollte (G1PolyGT, Tabelle 30 und Vgl. Abbildung 14 und Abbildung 23b). Die zweite Variante des AID-1-Aptamers enthielt zusätzlich zu den Basen-Austauschen von G1PolyGT zwei weitere Thymin-Basen (je eine in der oberen und unteren Tetrade) und wurde als G1NK3 bezeichnet (Tabelle 30 und Vgl. Abbildung 14 und Abbildung 23a).



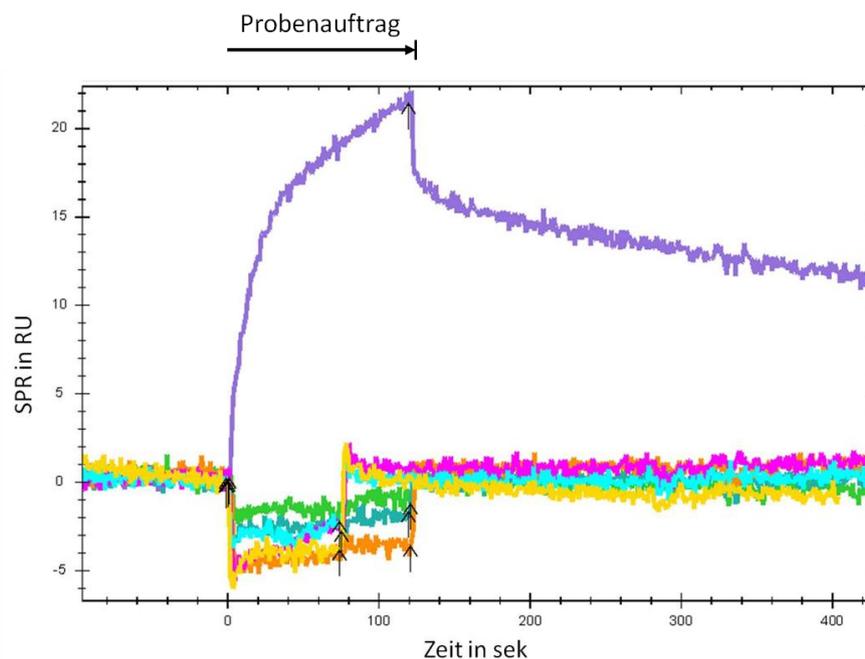
**Abbildung 24: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des AID-1-Aptamers sowie der Varianten G1NK3 (a) und G1PolyGT (b) in Abhängigkeit zum gewählten Puffersystem.** Die DNA-Lösungen (5  $\mu\text{M}$ ) wurden in PBS- und Tris-Puffer spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

G1NK3 wurde von Herrn Hansen als eine nicht Quadruplex-ausbildende Struktur identifiziert. Dieses Resultat sollte mittels CD-Spektroskopie verifiziert werden (Abbildung 24).

Aus den Ergebnissen der CD-spektroskopischen Messungen von G1PolyGT (Abbildung 24a) und G1NK3 (Abbildung 24b) ist zu schließen, dass beide AID-1-Varianten keine Quadruplex-typischen Kurven ausbildeten.

Abschließend wurden die AID-1-Varianten G1T, G2T, G3T, G6A, G6/14A, G1NK3 und G1PolyGT mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie auf ihre Fähigkeit geprüft, den humanen IL-6-Rezeptor zu binden. Hierzu wurde das Zielprotein Hyper-IL-6 auf einem SPR-Chip immobilisiert und die verschiedenen AID-1-Varianten über den Chip geleitet. Eine Interaktion zwischen Protein und DNA wurde über die Oberflächenplasmon-resonanz detektiert (Abbildung 25).

Bei Betrachtung des Sensorgramms ist ersichtlich, dass außer der Positivkontrolle (IL-6R-bindendes Aptamer AIR-3A) keine der untersuchten Varianten des AID-1-Aptamers zu einer Änderung der Resonanz geführt hat.



**Abbildung 25: Analyse der Interaktion der AID-1-Varianten mit Hyper-IL-6 über Oberflächenplasmonresonanz.** Hyper-IL-6 wurde auf einem SPR-Chip (SierraSensors) über EDC-NHS immobilisiert und 50  $\mu\text{L}$  einer 1  $\mu\text{M}$  DNA-Aptamer-Lösung bzw. 0,3  $\mu\text{M}$  AIR-3A-Aptamer-Lösung über den Chip geleitet (25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Im Anschluss an den Probenauftrag wurde die Flusszelle für 180 sek mit Selektionspuffer gewaschen. Die Bindung zwischen Protein und DNA wurde über die Änderung der Oberflächenplasmonresonanz detektiert, wobei die Resonanz in RU (Resonanz-Einheiten) gegen die Zeit aufgetragen wurde.  $\bullet$  AIR-3A-Aptamer,  $\bullet$  AID-1-G1T,  $\bullet$  AID-1-G3T,  $\bullet$  AID-1-G6A,  $\bullet$  AID-1-G6/14A,  $\bullet$  G1PolyGT,  $\bullet$  G1NK3.

### 5.1.2 CHARAKTERISIERUNG DES IL-6R-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMERS AID-1 ALS RNA-VARIANTE

Lauhon *et al.* und Walsh *et al.* war es unabhängig voneinander möglich zu zeigen, dass ein RNA-Aptamer als DNA-Variante identischer Sequenzabfolge in der Lage war, spezifisch dasselbe Target zu binden [92, 93]. Zudem war bekannt, dass Quadruplex-ausbildende DNA-Stränge als RNA-Moleküle derselben Sequenz ebenfalls Quadruplexe gleicher Struktur ausbilden und umgekehrt [94]. Aufgrund dessen wurde das DNA-Aptamer AID-1 in RNA umgeschrieben und auf die Struktur und Bindungsfähigkeit zum IL-6R untersucht.

#### 5.1.2.1 Analyse der Bindung des AID-1-RNA-Variante an Hyper-IL-6 mittels Filterbindungsanalyse

In Abschnitt 5.1.1 wurde das IL-6-Rezeptor-spezifische-DNA-Aptamer AID-1 und dessen Varianten auf die Fähigkeit den humanen IL-6R zu binden untersucht. Sowohl AID-1 als auch die Varianten AID-1-T, -G2T, -G6T, -G10T und -G14T wurden über *in vitro* T7-Transkription als die entsprechenden RNA-Analoga hergestellt (siehe Tabelle 31).

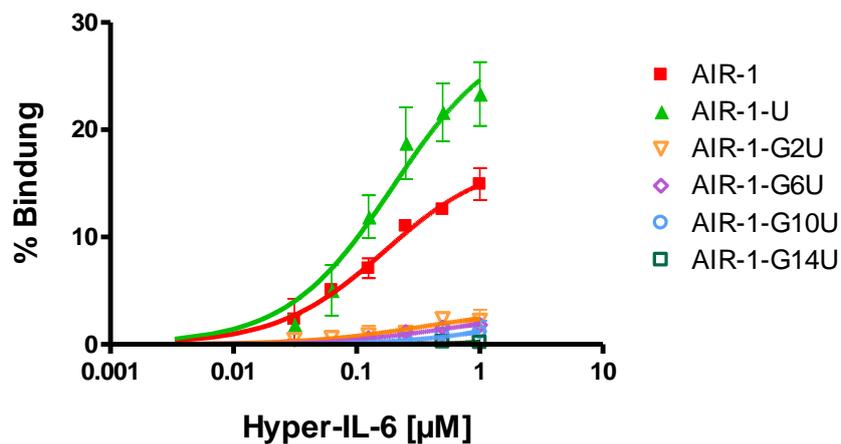
**Tabelle 31: Das IL-6R-bindende DNA-Aptamer AID-1 und davon abgeleitete Varianten als RNA-Analoga.** Dargestellt ist die RNA-Sequenz in 5'-3'-Richtung. In rot markiert sind Deletionen oder Abweichungen zum Aptamer AID-1 unterscheiden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AIR-1	GGGUGGGUGGGUGGGU
AIR-1-U	GGGUGGGUGGGUGGG -
AIR-1-G2U	<b>G</b> UGGGUGGGUGGGU
AIR-1-G6U	GGGUG <b>U</b> GGGUGGGU
AIR-1-G10U	GGGUGGGUG <b>U</b> GGGU
AIR-1-G14U	GGGUGGGUGGGUG <b>U</b> GU

Die Bindung der AID-1-RNA-Analoga an Hyper-IL-6 wurde über Filterbindungstests untersucht. Zu diesem Zweck wurden die RNAs radioaktiv markiert, mit steigenden Konzentrationen an Protein inkubiert und durch eine Nitrozellulosemembran filtriert. Die auf der Membran verbliebene Radioaktivität wurde detektiert und quantifiziert. Die Ergebnisse des Filterbindungstest wurden graphisch dargestellt, wobei die Hyper-IL-6 Konzentrationen gegen die Anteile der gebundenen RNA an das Protein aufgetragen wurden (Abbildung 26). Es ist deutlich ersichtlich, dass die AIR-1 und AIR-1-U an Hyper-IL-6 gebunden haben, da hier ein deutlicher Anstieg der prozentualen Bindung mit

steigender Proteinmenge zu sehen war. Im Gegensatz dazu war bei den untersuchten Varianten AIR-1-G2U, -G6U, -G10U und -G14U keine Bindung an Hyper-IL-6 erkennbar. Dieselben DNA als auch RNA-Varianten des Aptamers AID-1 waren nicht zu einer Interaktion mit Hyper-IL-6 in der Lage.

Anhand der Resultate des Filterbindungstests konnten Dissoziationskonstanten der untersuchten RNA-Varianten berechnet werden (Tabelle 32). Für AIR-1 wurde ein  $K_d$ -Wert von  $160 \pm 30$  nM und für AIR-1-U ein  $K_d$ -Wert von  $200 \pm 70$  nM bestimmt. Diese bestimmten  $K_d$ -Werte für die RNA-Varianten lagen im selben Bereich wie die der DNA-Aptamere (Tabelle 29: AIR-1-DNA  $190 \pm 60$  nM und AIR-1-T-DNA  $130 \pm 70$  nM). Die RNA-Varianten des AID-1-Aptamers stellen somit Aptamere dar, die den humanen IL-6-Rezeptor ebenfalls binden konnten.



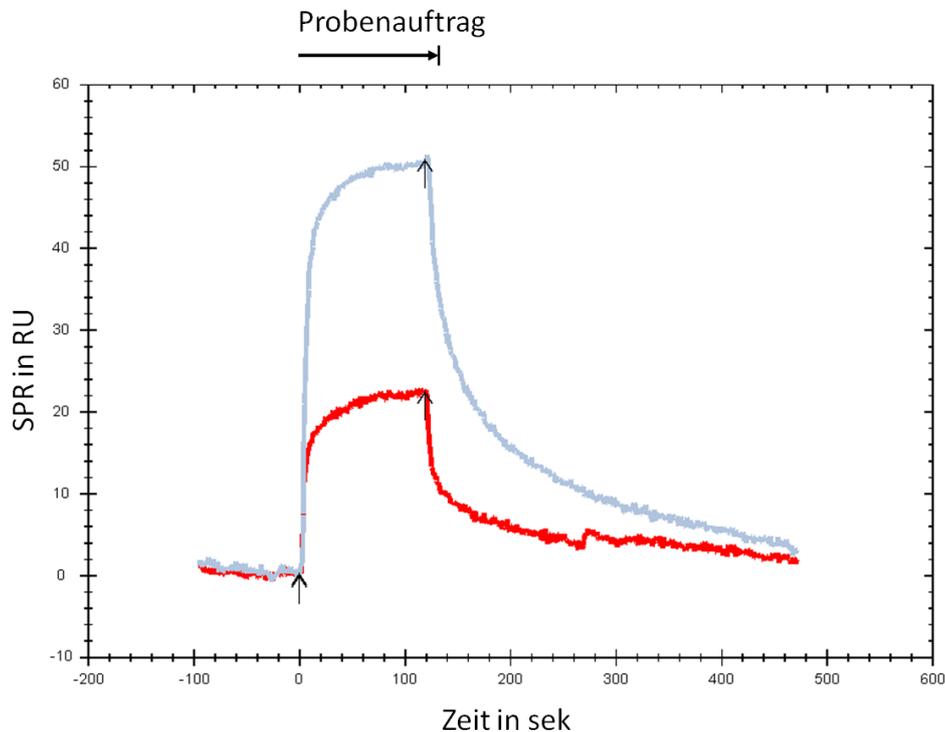
**Abbildung 26:** Graphische Auswertung des Filterbindungstests zur Analyse der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und dem AIR-1-Aptamer RNA-Analogen bzw. den davon abgeleiteten Varianten. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil der gebundenen RNA in Abhängigkeit von der Hyper-IL-6-Konzentration (0,03 – 1 µM) halblogarithmisch aufgetragen. Die gezeigten Daten wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten generiert.

**Tabelle 32:** Übersicht der Dissoziationskonstanten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und RNA-Moleküle die dem DNA-Aptamer AID-1 analog sind und davon abgeleitete Varianten. Für die AIR-1-Aptamer-Variante G14U konnten die ermittelten Werte nicht ermittelt werden.

	AIR-1	AIR-1-U	AIR-1-G2U	AIR-1-G6U	AIR-1-G10U	AIR-1-G14U
$K_d$ [µM]	$0,16 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,27$	$0,53 \pm 0,04$	$2,41 \pm 10,4$	-
$B_{max}$ [%]	$17,4 \pm 1,2$	$29,5 \pm 3,5$	$3,1 \pm 1,1$	$2,9 \pm 1,1$	$4,1 \pm 13,4$	-

Zur Verifizierung der Interaktionen zwischen Hyper-IL-6 und dem AID-1-Aptamer, sowohl als DNA- als auch als RNA-Variante, wurden SPR-Analysen durchgeführt. Hyper-IL-6 wurde auf einem SPR-Chip immobilisiert und die Aptamere nacheinander über den

Chip geleitet. Die resultierende Oberflächenplasmonresonanz wurde in einem Diagramm graphisch dargestellt, wobei die Änderung der Resonanz (in RU) gegen die Zeit aufgetragen wurde (siehe Abbildung 27).



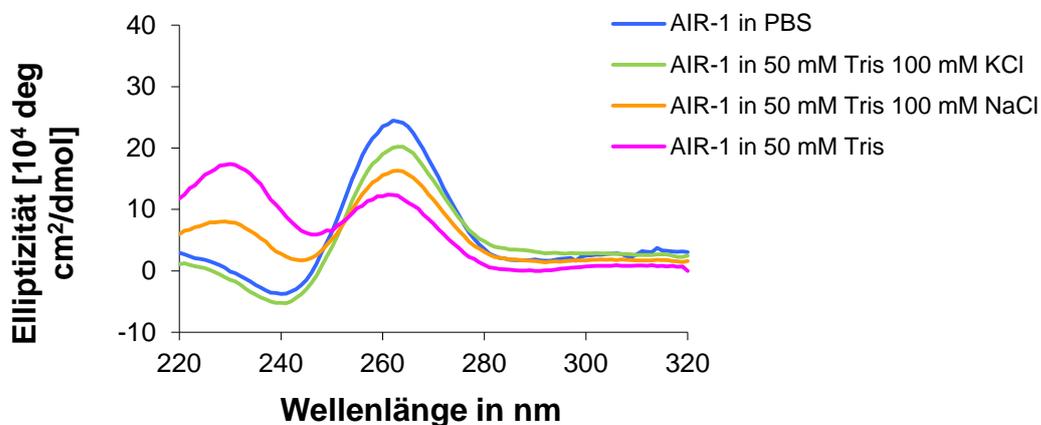
**Abbildung 27: Analyse der Interaktion des AID-1-Aptamers als DNA und RNA mit Hyper-IL-6 über Oberflächenplasmonresonanz.** Hyper-IL-6 wurde auf einem SPR-Chip (SierraSensors) über EDC-NHS immobilisiert und 50  $\mu\text{L}$  einer 1  $\mu\text{M}$  DNA bzw. RNA-Aptamer-Lösung über den Chip geleitet (25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Im Anschluss an den Probenauftrag wurde die Flusszelle für 180 sek mit Selektionspuffer gewaschen. Die Bindung zwischen Protein und DNA bzw. RNA wurde über die Änderung der Oberflächenplasmonresonanz detektiert, wobei die Resonanz in RU (Resonanz-Einheiten) gegen die Zeit aufgetragen wurde. ● AID-1, ● AIR-1.

Dem Sensorgramm in Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach dem Probenauftrag der beiden Aptamere die Resonanz anstieg und demzufolge sowohl AID-1 als auch AIR-1 an Hyper-IL-6 gebunden haben. Dabei bewirkte AIR-1 im Vergleich zum AID-1 eine halb so starke Antwort (RU). Im Anschluss an den Probenauftrag wurde Selektionspuffer über die Flusszelle geleitet und bewirkte einen Abfall der Resonanz bis auf den Ausgangspunkt zurück. Folglich verringerte sich die gebundene Masse, was auf die komplette Dissoziation beider Nucleinsäuren innerhalb 180 Sekunden vom Protein hindeutet.

### 5.1.2.2 Strukturanalyse des RNA-Aptamers AIR-1 mittels CD-Spektroskopie

AIR-1 liegt bekanntermaßen in einer als G-Quadruplex genannten Struktur vor [59]. Lauhon *et al.* identifizierte ein RNA-Aptamer, welches eine Quadruplex-Struktur aufwies und als DNA an das Zielmolekül zu binden vermochte, dies jedoch mit einer geringeren Affinität [93].

Ob das AIR-1 ebenfalls eine G-Quadruplex-Struktur einnimmt, wurde CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurden AIR-1 sowie weitere, davon abgeleitete Varianten AIR-1-U und G6U in PBS, Tris und Tris mit KCl oder NaCl vermessen. AIR-1-G10U und -G14U wurden lediglich in PBS vermessen (Abbildung 28).

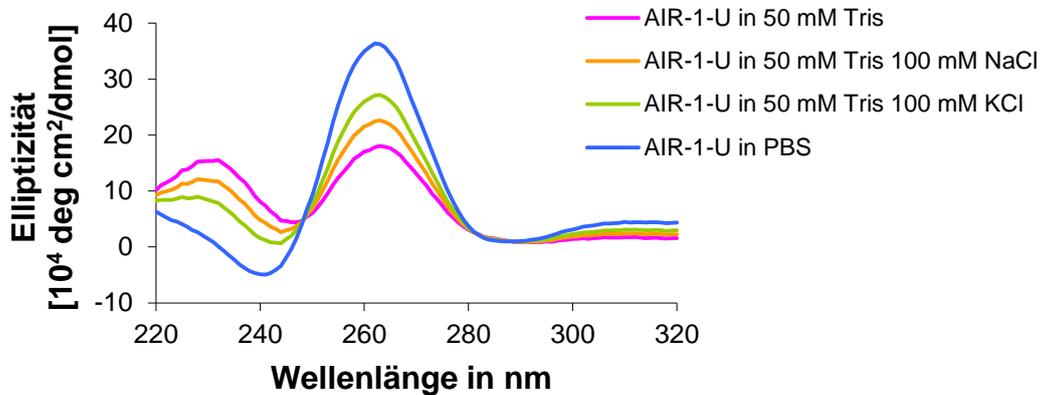


**Abbildung 28:** CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des AIR-1-RNA-Aptamers in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems. Die RNA-Lösungen (5  $\mu$ M) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

AIR-1 wies in PBS und in Tris-KCl eindeutig Quadruplex-typische negative Minima bei 240 nm und positive Maxima bei 264 nm auf. Diese Elliptizitätskurve war in Tris-Puffer, unabhängig von der An-oder Abwesenheit von NaCl, nicht vorhanden. AIR-1 wies somit dieselbe Elliptizitätskurven wie das ursprüngliche DNA-Aptamer auf (Vgl. Abbildung 14 und Abbildung 28).

Der Variante AIR-1-U fehlte im Gegensatz zu AIR-1 eine Base am 3'-Ende. Diese Modifikation wirkte sich im Falle des DNA-Aptamers positiv bezüglich der Strukturstabilität und Affinität zum Zielprotein aus. AIR-1-U wurde CD-spektroskopisch vermessen und bei Betrachtung der resultierenden Ergebnisse (Abbildung 29) konnte für AIR-1-U ebenfalls der für G-Quadruplex charakteristische Kurvenverlauf beobachtet

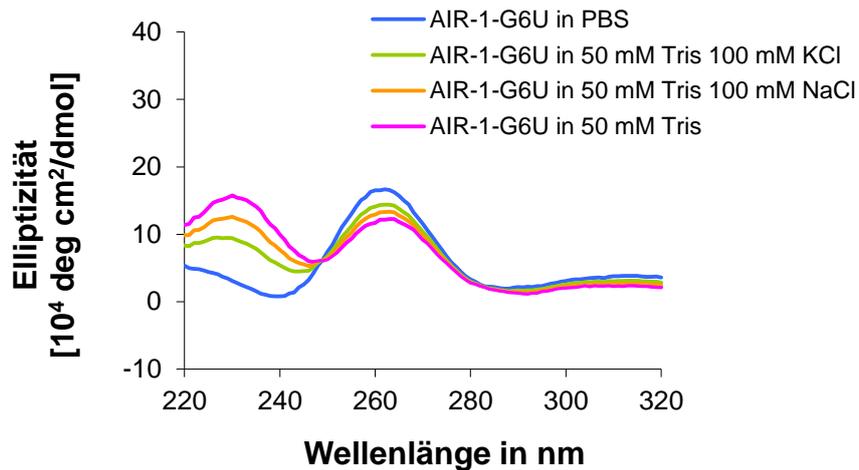
werden. Im Vergleich zum AIR-1 wies AIR-1-U größere Elliptizitätsmaxima auf. Desweiteren waren die Elliptizitätsmaxima bzw. -minima bei AIR-1-U in PBS am größten und nahmen in der Reihenfolge Tris-KCl, Tris-NaCl und Tris ab. Dies wurde ebenfalls für das AID-1-T beobachtet (Vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 29: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AIR-1-RNA-Aptamer-Variante AIR-1-U in Abhängigkeit vom gewählten Puffersystem.** Die RNA-Lösungen ( $5 \mu\text{M}$ ) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Das Fehlen der 16. Base im AID-1-Aptamer bewirkte, unabhängig davon ob in Form von DNA oder RNA, sowohl eine Verbesserung der Bindung zum Zielprotein als auch eine Stabilisierung der Quadruplex-Struktur.

Im Folgenden wurden AIR-1-Varianten untersucht, in denen jeweils eine Guanin-Base der mittleren Tetrade gegen eine Uracil-Base ausgetauscht wurde. Diese RNA-Varianten verloren wie die DNA-Analoga die Fähigkeit an Hyper-IL-6 zu binden. CD-spektroskopische Untersuchungen dieser Varianten sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern der Basen-Austausch einen Einfluss auf die Quadruplex-Struktur nimmt. AIR-1-G6U wurde in allen vier Puffern vermessen und die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 30a zeigte für AIR-1-G6U kein negatives Minimum bei 240 nm, jedoch das Quadruplex-typische positive Maximum bei 264 nm.

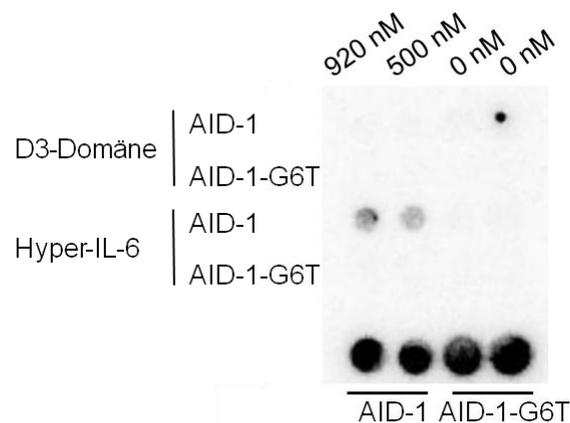


**Abbildung 30: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der AIR-1-RNA-Aptamer-Varianten AIR-1-G6U in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems.** Die RNA-Lösungen ( $5 \mu\text{M}$ ) wurden in verschiedenen Puffern spektroskopisch bei Wellenlängen zwischen 220 und 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

Die Struktur der AIR-1-RNA-Varianten G10U und G14U wurden ebenfalls untersucht (nicht gezeigt) und beide Varianten zeigten die für Quadruplexe charakteristischen Merkmale. Dies wurde im Kurvenverlauf deutlich, da dieser ein negatives Minimum bei 240 nm und ein positives Maximum bei 164 nm aufwies.

### 5.1.3 ANALYSE DER BINDUNG IL-6R-SPEZIFISCHER DNA-APTAMERE AN DESSEN DOMÄNE D3

Der extrazelluläre Teil des Interleukin-6-Rezeptors besteht aus den drei Domänen D1, D2 und D3. Um Aufschluss darüber zu bekommen, an welcher dieser Domänen das DNA-Aptamer AID-1 im Speziellen bindet, wurde ein Bindungstest mit der rekombinant hergestellten D3-Domäne durchgeführt. Die D3-Domäne ist für die Wechselwirkung mit gp130 und dem Zytokin IL-6 verantwortlich (siehe 1.1 und Abbildung 2). Zur Untersuchung, ob das DNA-Aptamer AID-1 an die D3-Domäne bindet, wurde diese DNA radioaktiv markiert und mit verschiedenen Konzentrationen der D3-Domäne versetzt. Anschließend wurde der Bindungsansatz über eine Nitrozellulosemembran filtriert und die an das Protein gebundene DNA detektiert. Als Kontroll-DNA dienten eine nicht bindende Aptamer-Variante AID-1-G6T. Als Positiv-Kontrolle diente die Bindung an Hyper-IL-6. In Abbildung 31 ist der Filterbindungstest dargestellt.

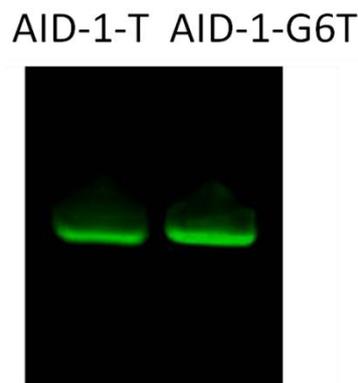


**Abbildung 31: Bindung des DNA-Aptamers AID-1 bzw. der Variante G6T an die D3-Domäne des humanen IL-6-Rezeptors.** <sup>32</sup>P markierte DNA wurde mit verschiedenen Mengen Protein inkubiert und eine Bindung über einen Filterbindungstest untersucht. Es wurden die DNA-Aptamere AID-1 und dessen nicht bindende Variante AID-1-G6T untersucht. Dabei wurden je 500 und 920 nM des Proteins, sowie je zwei Kontrollen ohne Zusatz von Protein durchgeführt. Die Detektion erfolgte über Autoradiographie. Eine Schwarzfärbung deutete auf gebundenes Aptamer hin.

Im Falle einer Bindung zwischen Aptamer und Protein würde dies über eine Schwarzfärbung des entsprechenden Punktes auf der Membran sichtbar. Solch eine Färbung war lediglich für das AID-1-Aptamer an Hyper-IL-6 zu detektieren. Die Inkubation des AID-1-Aptamers mit der D3-Domäne führte zu keiner Verfärbung. Es konnte also keine Wechselwirkung zwischen dem DNA-Aptamer AID-1 und der D3-Domäne beobachtet werden. Die Variante AID-1-G6T, zeigte wie erwartet keine Bindung an Hyper-IL-6 bzw. D3. Es war nicht möglich die anderen Domänen im Einzelnen zu untersuchen, da diese nicht zur Verfügung standen.

#### 5.1.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER BINDUNG VON DNA-APTAMEREN AN IL-6R-TRAGENDE ZELLEN

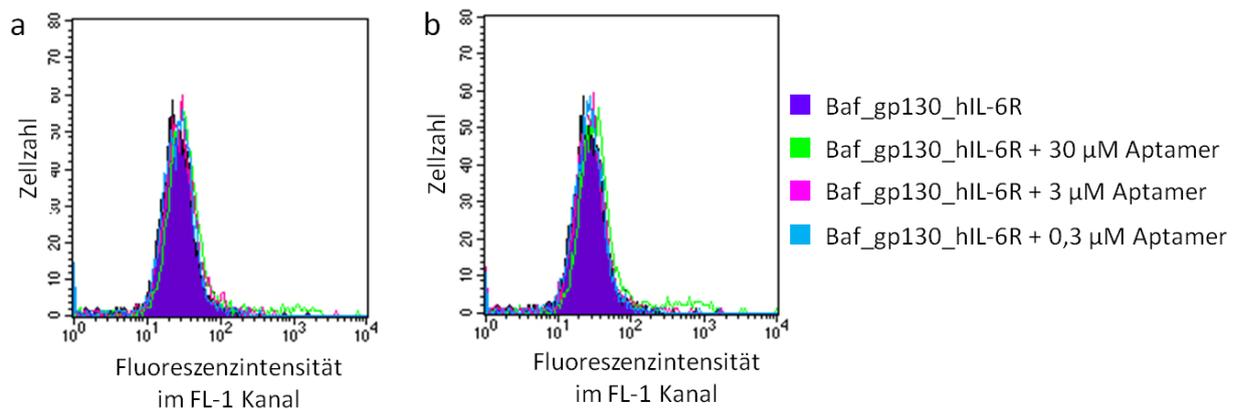
Die Bindung des DNA-Aptamers AID-1 an den rekombinant produzierten humanen IL-6-Rezeptor konnte anhand von Filterbindungstests und SPR-Analysen nachgewiesen werden. Nun stellte sich die Frage, ob das DNA-Aptamer AID-1 auch den nativen hIL-6-Rezeptor auf Oberflächen eukaryotischer Zellen binden kann. Als Zelllinien dienten murine Prä-B-Zellen, die den hIL-6-Rezeptor tragen (Baf\_gp130\_hIL-6R). Um diese Fragestellung durchflusszytometrisch beantworten zu können, wurden die DNA-Aptamere AID-1-T und AID-1-G6T am 3'-Ende mit dem Fluorophor Alexa488 markiert, gelelektrophoretisch getrennt und mittels Fluoreszenzdetektion im PPA-Gel visualisiert (siehe Abbildung 32). Es sind zwei gleichgroße distinkte Banden zu sehen, die unter UV-Licht-Absorption zur Floreszenz befähigt waren.



**Abbildung 32: Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung des DNA-Aptamers AID-1-T und der Variante AID-1-G6T.** Die elektrophoretische Analyse der Alexa488-markierten DNA-Aptamere (5 pmol, käuflich erworben) erfolgte in 10%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad unter Verwendung eines Alexa488-Filters.

Der Bindungstest zwischen dem Alexa488-markierten DNA-Aptamer bzw. der Variante G6T und den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Dieser Bindungstest diente zur Verifizierung vorangegangener Arbeiten, in denen bereits gezeigt wurde, dass diese fluoreszenzmarkierten Aptamere nicht in der Lage waren, an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen zu binden [58]. Hierzu wurden Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen mit variierenden Konzentrationen an DNA (0,3 - 30  $\mu$ M) für 30 Minuten auf Eis inkubiert und die Bindung der fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide an den Zellen untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Histogramm-Plot, wobei die Zellzahl gegen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurde. Eine Aptamer-

bindung würde zu einer verstärkten Fluoreszenzintensität führen, die wiederum an einer Verschiebung im Histogramm-Plot ersichtlich wäre.



**Abbildung 33: Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung von Alexa488-markierten DNA-Aptameren an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Es wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen mit 0,3  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Aptamer für 30 Minuten auf Eis inkubiert und durchflusszytometrisch vermessen. In Form eines Histogramm-Plots wurden die Ergebnisse dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

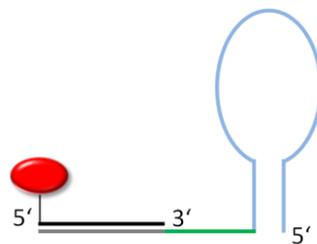
In Abbildung 33 sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen dargestellt. Es konnte sowohl für AID-1-T-Alexa488 (Abbildung 33a) als auch für AID-1-T-G6T-Alexa488 (Abbildung 33b) keine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese fluoreszenzmarkierten DNA-Aptamere nicht zur Bindung an die hIL-6-R-tragenden Zellen befähigt waren.

### 5.1.5 DIMERISIERUNG DES IL-6R-BINDENDEN DNA-APTAMERS AID-1

Nachdem durchflusszytometrisch keine Interaktion zwischen dem IL-6R-spezifischen DNA-Aptamer AID-1-T und dem nativen IL-6R auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte, sollte folgend der Einfluss einer Dimerisierung des Aptamers auf die Interaktion mit IL-6R-tragenden Zielzellen untersucht werden. Offen bleibt des Weiteren die Frage, ob für die mit Alexa488 markierte DNA eine schwache Bindung hätte gezeigt werden können, da die untersuchten Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen bei Anregung mit einem Argon-Laser eine starke Eigenfluoreszenz aufwiesen.

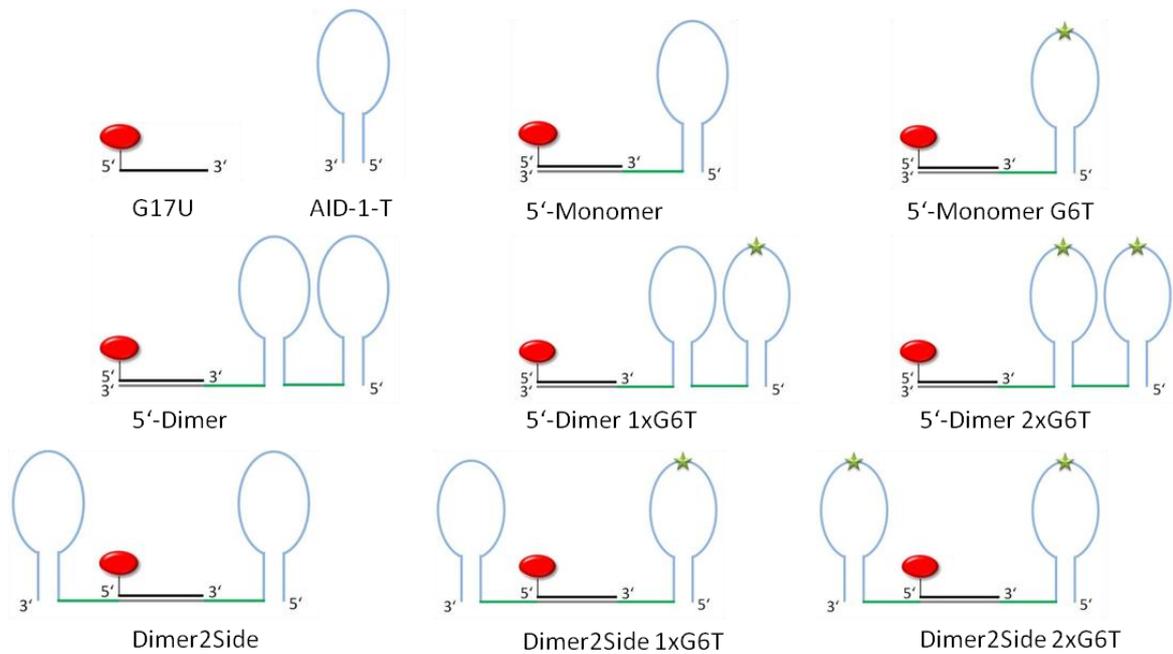
Den Anstoß zur Multimerisierung des Aptamers lieferte die Arbeit von McNamara *et al.* [95], die zeigte, dass das 4-1BB-Rezeptor-bindende DNA-Aptamer als Dimer-Variante im Gegensatz zum Monomer verbesserte Bindungseigenschaften zum 4-1BB-Rezeptor aufwies.

Zur Konstruktion und zum schnellen Screening verschiedener Dimer-Varianten des DNA-Aptamers AID-1-T wurde zunächst ein Monomer am 3'-Ende mit einem 28 Nucleotide langen Linker versehen. An diesen Linker konnte ein komplementäres 19 Nucleotide langes Oligonucleotid (AIR-3A-G17U RNA Atto647N) hybridisiert werden, welches am 3'-Ende mit Atto647N modifiziert war (siehe Abbildung 34). Nach Hybridisierung des Oligonucleotids verblieben neun Nucleotide zwischen Aptamer und Hybrid einzelsträngig. Die nicht-bindende Kontrolle zum 5'-Monomer stellte das Konstrukt AID-1-G6T dar. AID-1-G6T wurde in vorherigen Untersuchungen als nicht an IL-6R-bindende DNA-Variante identifiziert, bei der an Position 6 der Guanosin gegen einen Thymidin ausgetauscht wurde (5.1.1).



**Abbildung 34: Schematische Darstellung des DNA-Aptamers AID-1-T 5'-Monomer und dessen Modifikation zur Fluoreszenzmarkierung.** Das DNA-Aptamer AID-1-T (hell-blau, siehe Tabelle 6) wurde am 3'-Ende mit einem 9-nt-Linker (grün) versehen. Dieser Linker wurde wiederum um 19-nt verlängert (grau), an das das Atto647N-modifizierte Oligonucleotid AIR-3A-G17U RNA (schwarz) hybridisiert werden konnte.

Ausgehend von diesem Monomer (Abbildung 34, 5'-Monomer) war eine schnelle Generierung verschiedener Dimere oder weiterer Multimere möglich, die durchflusszytometrisch auf die Bindungsfähigkeit an IL-6R-tragende Zellen untersucht werden konnten. Dazu wurden zunächst zwei verschiedene Dimere erzeugt. Ausgehend vom 5'-Monomer wurde dieses am 5'-Ende um einen neun Nucleotide langen Linker verlängert, an dem ein weiteres Monomer AID-1-T folgte (=5'-Dimer). Die zweite Dimer-Variante wurde ausgehend vom 5'-Monomer am 3'-Ende über einen neun Nucleotide langen Linker um das AID-1-T Aptamer verlängert (=Dimer2Side). Das Dimer2Side wies somit vom doppelsträngigen Bereich aus beiderseits je ein AID-1-T-Aptamer auf. Varianten dieser Dimere mit AID-1-T-G6T wurden ebenfalls untersucht. In Abbildung 35 sind die untersuchten Monomere oder Dimere des DNA-Aptamers AID-1-T zusammengefasst. Die dazugehörigen Sequenzen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

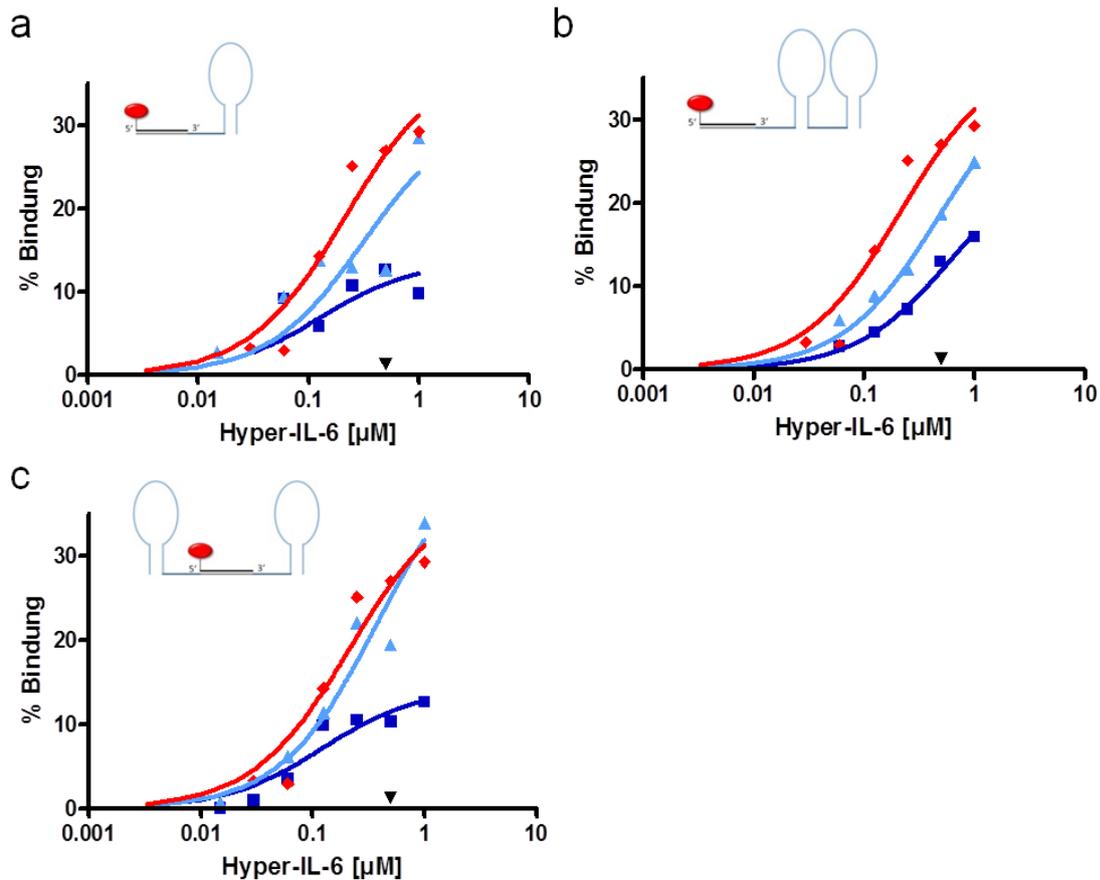


**Abbildung 35: Schematische Darstellung des DNA-Aptamers AID-1-T und dessen dimerisierten Varianten.** Basierend vom 5'-Monomer wurden diverse Dimere erstellt. Die dazugehörigen nicht bindenden G6T-Varianten, weisen einen Basen-Austausch des Guaninrestes an 6. Position gegen einen Thyminrest auf und sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Dazugehörige Sequenzen sind Tabelle 6 zu entnehmen. G17U-RNA 5'-Atto647N (schwarz), AID-1-T-DNA-Aptamer (hellblau), Linker (grün).

### 5.1.5.1 Analyse der Interaktion zwischen ausgewählten Dimeren des DNA-Aptamers AID-1 an Hyper-IL-6 mittels Bindungsstudien

In analytischen Filterretentionsstudien sollte untersucht werden, ob die erzeugten Dimere noch immer die Fähigkeit hatten, Hyper-IL-6 zu binden, oder ob die Dimerisierung eine Inaktivierung zur Folge hatte. Hierzu wurden das 5'-Monomer, 5'-Dimer und das Dimer2Side radioaktiv markiert und mit steigenden Hyper-IL-6-Konzentrationen inkubiert und in einem Filterbindungstest analysiert. Dabei wurden die Dimere mit und ohne hybridisierten Gegenstrang (AIR-3A-G17U RNA) getestet. Als Kontrolle dienten das Aptamer AID-1-T selbst und die AIR-3A-G17U-RNA (19 nt), welche keine Affinität für Hyper-IL-6 aufweisen sollte.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Es wurde die Konzentration an Hyper-IL-6 gegen den Anteil an gebundener DNA aufgetragen. Beim Vergleich der Bindungskurven der einzelnen Dimer-Konstrukte mit dem AID-1-T-Aptamer alleine wiesen das 5'-Monomer, das 5'-Dimer sowie das Dimer2Side eine Bindung zu Hyper-IL-6 auf.



**Abbildung 36: Graphische Auswertung des Filterbindungstests zur Analyse der Interaktion zwischen dem 5'-Monomer (a) bzw. 5'-Dimer (b) und Dimer2Side (c) mit Hyper-IL-6 mittels Bindungsstudien.** Steigende Konzentrationen von Hyper-IL-6 wurden mit radioaktiv markierten Aptameren inkubiert. Zur Kontrolle wurde G17U mit Hyper-IL-6 inkubiert und analysiert. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil des gebundenen DNA-Aptamers in Abhängigkeit zur Hyper-IL-6-Konzentration (0,03 – 1  $\mu\text{M}$ ) halblogarithmisch aufgetragen. Die gezeigten Daten wurden aus einem Experiment generiert.  $\blacklozenge$  AID-1-T,  $\blacktriangle$  Aptamer hybridisiert mit G17U,  $\blacksquare$  Aptamer ohne G17U,  $\blacktriangledown$  G17U-RNA.

Dies ist am prozentualen Anstieg der Bindung bei steigenden Proteinkonzentrationen zu entnehmen. Die G17U-RNA wies wie erwartet keine Bindung zum Protein auf. Die entsprechenden  $K_a$ -Werte wurden ebenfalls im Bereich des AID-1-T-Aptamers bestimmt (Vgl. Tabelle 29 und Tabelle 33) und lagen zwischen 0,13 bis 0,47  $\mu\text{M}$ .

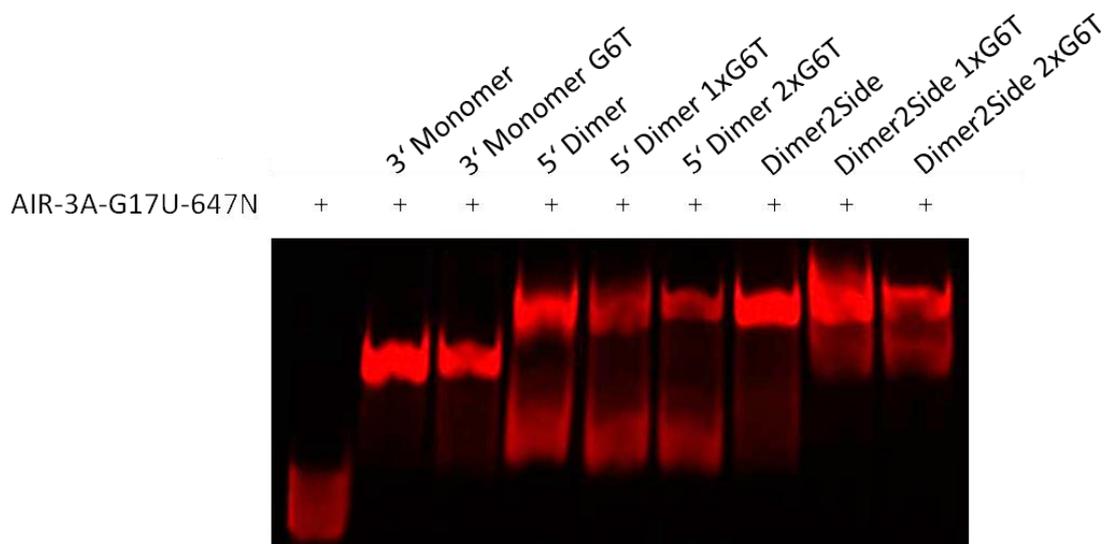
**Tabelle 33: Übersicht der  $K_a$ -Werte der AID-1-Dimere im Vergleich.** Aptamere wurden vor der Bindungsstudie mit unmarkiertem G17U hybridisiert und ebenfalls analysiert.  $B_{max}$  [%] gibt die maximale Bindung in Prozent an. Die Messung von G17U konnte mit der verwendeten Software nicht ausgewertet werden.

	AID-1-T	3'- Monomer	3'-Monomer	5'-Dimer	5'-Dimer	Dimer 2 Side	Dimer 2 Side
AIR-3A-G17U	-	-	+	-	+	-	+
$K_a$ [ $\mu\text{M}$ ]	0,22	0,13	0,32	0,62	0,47	0,12	0,38
$B_{max}$ [%]	37,94	13,71	32,11	26,51	36,47	14,36	44,08

Es wurde zudem die Bindung der G6T-Varianten vom 5'-Monomer, 5'-Dimer und Dimer2Side mittels SPR analysiert, wobei keine dieser Varianten eine Bindung an Hyper-IL-6 aufwies (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.5.2 Interaktion zwischen AID-1-Dimeren und IL-6R-tragenden Zellen

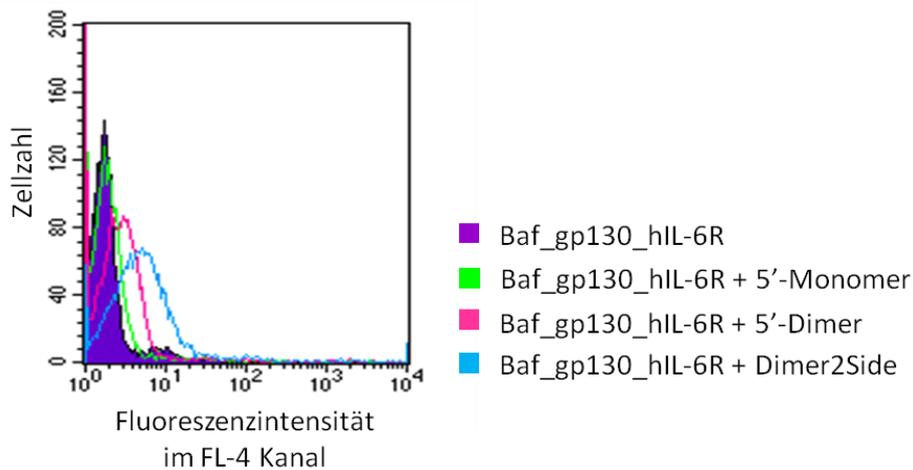
In vorhergehenden Versuchen konnte anhand von Filterretentionsstudien gezeigt werden, dass das 5'-Monomer und die Dimere des AID-1-T-Aptamers an das Protein Hyper-IL-6 binden. Ob zum einen der Wechsel des Fluorophors oder zum anderen die Dimerisierung des Aptamers eine Zell-spezifische Bindung ermöglicht, sollte mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Das 5'-Monomer und die Dimere wurden an die komplementäre, fluoreszenzmarkierte RNA hybridisiert und der Erfolg der Fluoreszenzmarkierung gelelektrophoretisch untersucht (Abbildung 37). Die Hybridisierung ist am verlangsamteten Laufverhalten der Hybride erkennbar. AIR-3A-G17U hybridisierte mit allen Dimeren.



**Abbildung 37: Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung der Dimere.** Die Dimere und das 5'-Monomer sowie deren nicht-bindenden G6T-Varianten wurden an die mit Atto647N-markierte RNA AIR-3A-G17U hybridisiert und jeweils 10 pmol in einem 10%igen nativem Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch getrennt. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad unter Verwendung eines Atto647-Filters.

Es folgte die Inkubation der fluoreszenzmarkierten Konstrukte (70 nM, 30 min auf Eis) mit den Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen, die den humanen IL-6R auf der Zelloberfläche trugen (Baf\_gp130\_hIL-6R). In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bindungstests als Histogramm-Plot dargestellt. Für das 5'-Monomer (grün) konnte bei

der gemessenen Konzentration keine Bindung an das Aptamer festgestellt werden, da sich die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Autofluoreszenz (lila) nicht änderte. Die Dimere hingegen wiesen eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf. Es konnte für die Dimere eine Bindung an IL-6-Rezeptoren-tragenden Zellen nachgewiesen werden, wobei das Dimer2Side eine stärkere Verschiebung der Fluoreszenzintensität bewirkte als das 5'-Dimer und folglich stärker als das 5'-Dimer binden konnte.

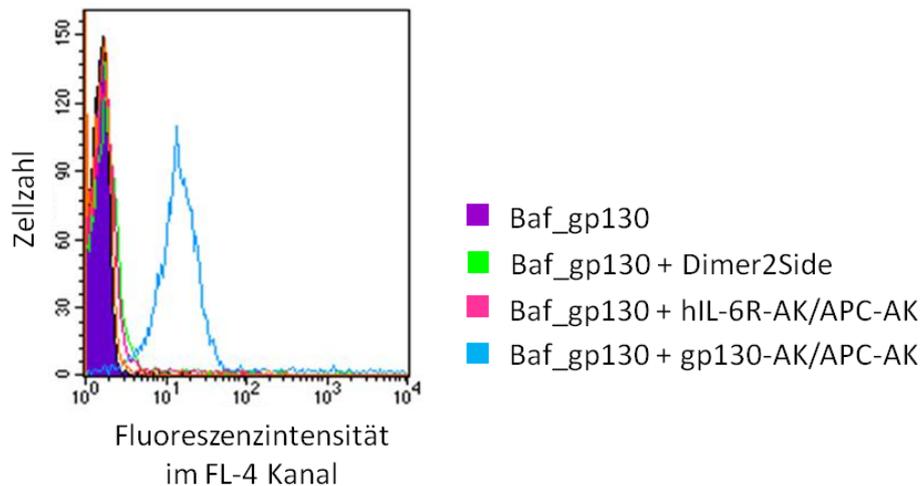


**Abbildung 38: Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung der AID-1-T-DNA-Aptamere als Monomer und Dimer an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Es wurden je  $10^5$  Zellen mit den AID-1-T-Aptamer-Varianten 5'-Monomer, 5'-Dimer und Dimer2Side (70 nM) für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse wurden in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Um eine unspezifische Bindung des Dimer2Side an die Baf-Zellen auszuschließen, wurde das Aptamer mit den Kontroll-Zellen Baf\_gp130 inkubiert (70 nM, 30 min auf Eis). Diese unterscheiden sich zu den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen darin, dass sie nicht mit der cDNA des humanen IL-6R stabil transfiziert waren und somit keinen nativen IL-6R auf der Zelloberfläche präsentierten. Der immunologische Nachweis der Expression von gp130 und IL-6R auf der Oberfläche von Baf\_gp130- bzw. Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung gp130- bzw. hIL-6R-spezifischer Primärantikörper und APC-fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Die Ergebnisse sind dem Histogramm-Plot in Abbildung 39 zu entnehmen.

In der graphischen Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse ist zu sehen, dass lediglich die Inkubation mit dem gp130 AK zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität führte. Demzufolge konnte gp130 auf den Baf\_gp130-Zellen nachgewiesen werden und der humane IL-6-Rezeptor hingegen nicht. Außerdem ist zu sehen, dass das Dimer2Side ebenfalls zu keiner Verschiebung der Fluoreszenzintensität

fürte und folglich nicht an die Baf\_gp130-Zellen gebunden hat. Die Bindung des Dimer2Side ist folglich nicht auf eine unspezifische Bindung an Baf-Zellen zurückzuführen.



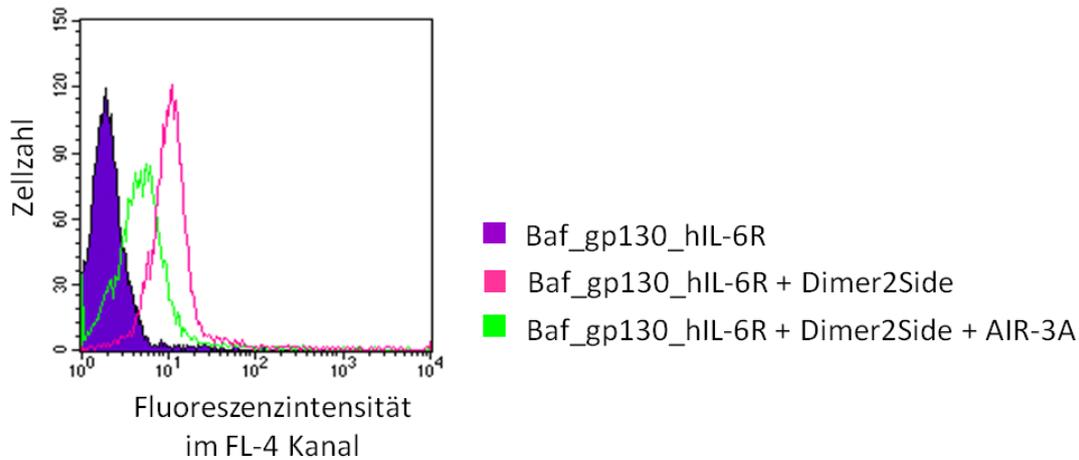
**Abbildung 39: Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung der AID-1-T-DNA-Aptamer-Variante Dimer2Side an Baf\_gp130-Zellen.** Es wurden je 10<sup>5</sup> Zellen mit der Aptamer-Variante Dimer2Side (70 nM) bzw. Antikörper (1:350) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die primären Antikörper waren gegen den humanen IL-6R und gp130 gerichtet und wurden über sekundäre APC-floureszenzmarkierte Antikörper detektiert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung, deren Ergebnisse hier in Form eines Histogramm-Plots dargestellt wurden, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

### 5.1.5.3 Bestimmung der Bindungsspezifität des Dimer2Side durch Kompetition mit unmarkiertem IL-6R-spezifischen AIR-3A

Die Bindung des Dimer2Side an hIL-6-tragende Zellen konnte über Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Um die Spezifität dieser Bindung zu belegen, wurden Baf\_gp130\_hIL-6-Zellen mit dem Dimer2Side inkubiert, mit Selektionspuffer gewaschen und anschließend wurde unmarkiertes AIR-3A im zehnfachen Überschuss hinzugegeben. Bei dem Aptamer AIR-3A handelt es sich um ein RNA-Aptamer, welches spezifisch an den humanen IL-6R bindet. Zudem weist AIR-3A im Vergleich zu AID-1 eine höhere Affinität zum hIL-6R auf und konkurriert um dieselbe Bindungsstelle des Rezeptors [57]. AIR-3A sollte das Dimer2Side von der Zelloberfläche verdrängen.

In Abbildung 40 sind die über Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse dargestellt, denen zu entnehmen ist, dass die zusätzliche Inkubation mit unmarkiertem AIR-3A-Aptamer zu einer verringerten Fluoreszenzintensität führte. Folglich konnte die Bindung des Dimer2Sides an den hIL-6R über AIR-3A verdrängt werden. Daraus war zu

schließen, dass es sich bei der Bindung des Dimer2Side um eine spezifische Bindung an den IL-6-Rezeptor handelte.



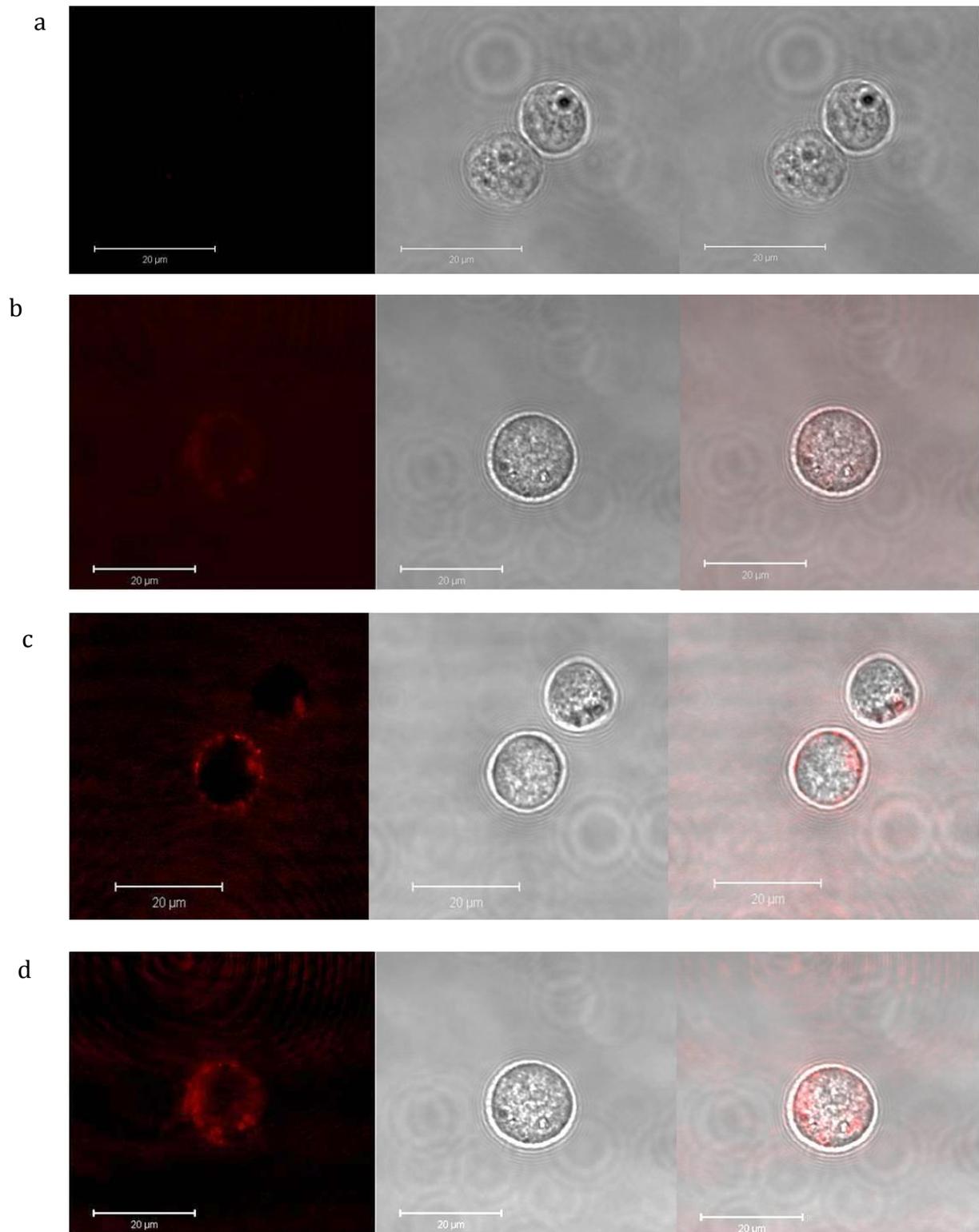
**Abbildung 40: Bindung der AID-1-DNA-Aptamer-Variante Dimer2Side an Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen und die Verdrängung über das AIR-3A-Aptamer.** Es wurden je 10<sup>5</sup> Zellen mit der Aptamer-Variante Dimer2Side (70 nM) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Verdrängung des Dimer2Sides über die Zugabe des AIR-3A-Aptamers im 10-fachen molaren Überschuss. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung, deren Ergebnis in Form eines Histogramm-Plots dargestellt wurde, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Die Dimer2Side waren hingegen nicht in der Lage (50-facher molarer Überschuss), gebundenes AIR-3AAtto647N von der Oberfläche von Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen zu verdrängen (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 5.1.5.4 Mikroskopische Visualisierung der Interaktion zwischen ausgewählten Dimer-Konstrukten und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die AID-1-Konstrukte 5'-Dimer und Dimer2Side im Gegensatz zum 5'-Monomer an hIL-6R-tragende Zellen binden konnten. Zusätzlich konnte die Spezifität der Bindung des Dimer2Sides gezeigt werden. Diese Bindungen am IL-6R auf Zellen wurde zusätzlich mikroskopisch dargestellt (siehe Abbildung 41).

Die Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen zeigten unter den verwendeten mikroskopischen Einstellungen keine Autofluoreszenz (Abbildung 41a). Im Falle des 5'-Monomers war nur eine sehr schwache Rotfärbung der Zellen zu erahnen (Abbildung 41b). Beide Dimer-Konstrukte 5'-Dimer und Dimer2Side hingegen bildeten einen deutlichen rot fluoreszierenden Ring um die gezeigten Zellen (Abbildung 41c und d). Diese mikroskopisch generierten Bilder bestätigen die vorhergehenden Ergebnisse aus 5.1.5.2. Die Dimere banden an IL-6R-tragenden Zellen.

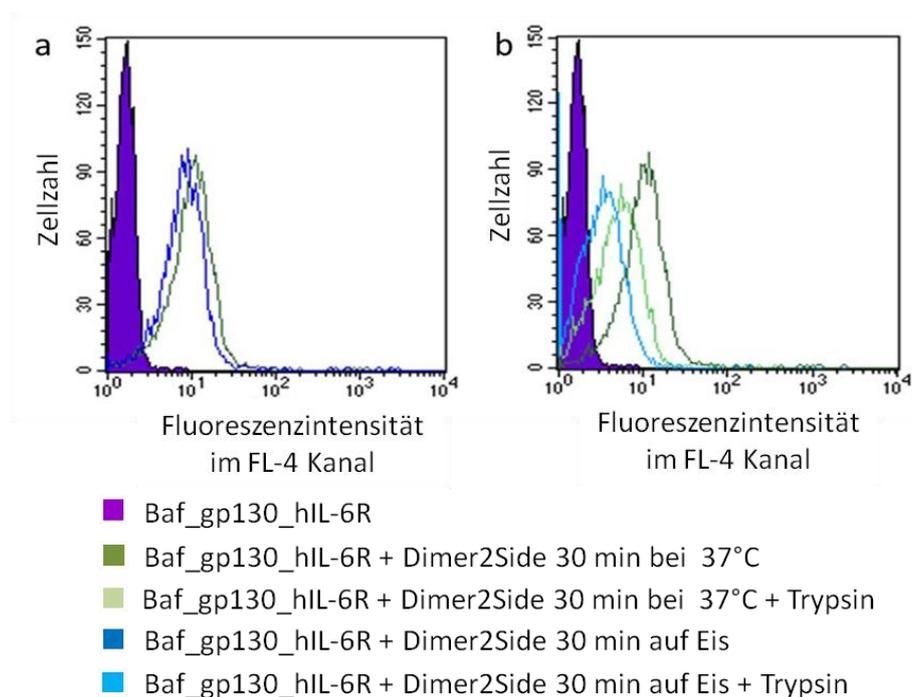


**Abbildung 41: Bindung von AID-1-DNA-Varianten 5'-Monomer, 5'-Dimer und Dimer2Side an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen (a) wurden mit dem 5'-Monomer (b), 5'-Dimer (c) und Dimer2Side (d) inkubiert, gewaschen und Fluoreszenz-mikroskopisch visualisiert. Dargestellt sind die Emission bei 633 nm in Rot (links), Durchlicht (mittig) und Überlagerung beider Kanäle (rechts). Maßstab 20 µm (weiße Linie).

### 5.1.5.5 Internalisierung von Dimer2Side in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen

Rezeptoren unterstehen Recycling-Prozessen, in denen sie bei 37 °C in die Zelle internalisiert werden. Unterbunden wird dieser Vorgang, wenn die betreffenden Zellen auf Eis gehalten werden. Der Nachweis einer Internalisierung kann mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Dazu muss von außen gebundenes Aptamer von im Inneren befindlichem Aptamer unterschieden werden. Dies wird beispielsweise durch einen unspezifischen enzymatischen Proteinabbau über Trypsin gewährleistet. Aptamere, die sich im Inneren der Zelle befinden, werden von einer Trypsinbehandlung nicht beeinflusst.

Um eine Internalisierung des Dimer2Side durch IL-6R-tragende Zellen zu analysieren, wurden die Fluoreszenz markierten Dimere mit den Zellen für 30 Minuten auf Eis bzw. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges und ungebundenes Aptamer durch Waschstschritte entfernt und die Zellen in Trypsin-haltigem Puffer aufgenommen. Nach fünf Minuten bei 37 °C wurden die Zellen zentrifugiert und durchflusszytometrisch vermessen (Abbildung 42).



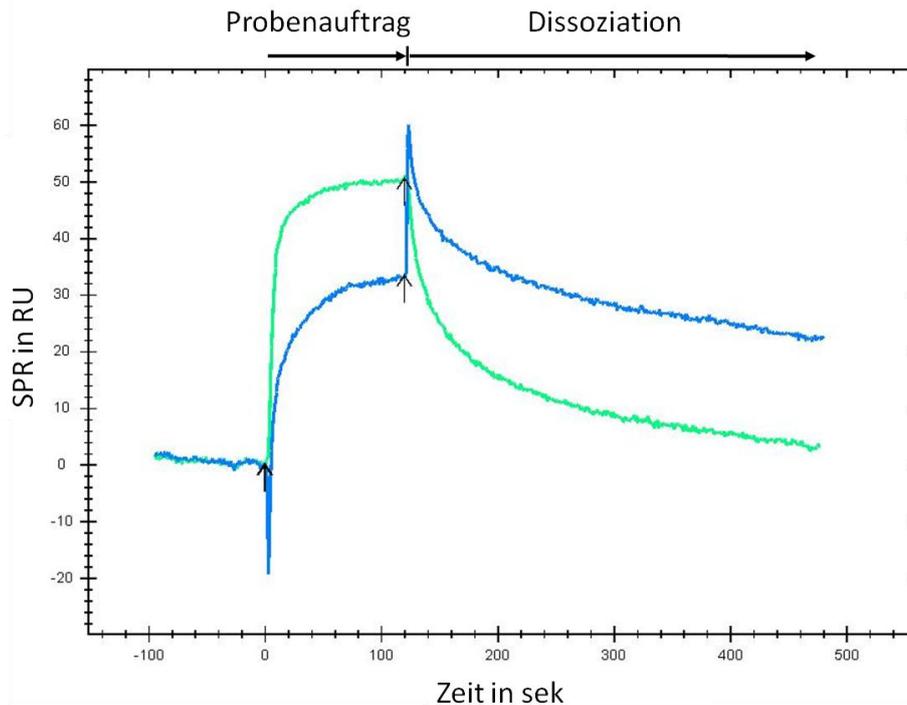
**Abbildung 42: Internalisierung der AID-1-Aptamer-Variante Dimer2Side in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Es wurden je  $10^5$  Zellen mit der Aptamer-Variante Dimer2Side (70 nM) für 30 Minuten auf Eis bzw. im Vergleich dazu bei 37 °C inkubiert. Nach Trypsinbehandlung wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse wurden in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden. Inkubation auf Eis bzw. bei 37 °C ohne Trypsin (a) und nach Trypsin-Behandlung (b).

Die Inkubation der Zellen mit dem Dimer2Side auf Eis und bei 37 °C ergab dieselbe Änderung bezüglich der Fluoreszenzintensität (Abbildung 42a). Daraufhin wurden die beiden Trypsin-behandelten Ansätze analysiert, die nur bei 37 °C inkubiert wurden (Abbildung 42b). Eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität nach links deutet auf weniger gebundenes Aptamer hin. Die detektierte Fluoreszenzintensität nahm in der Reihenfolge „Inkubation bei 37 °C“, „Inkubation bei 37 °C mit Trypsin-Behandlung“ und „Inkubation auf Eis mit Trypsin-Behandlung“ ab. Die Trypsin-behandelten Zellen wiesen geringere Fluoreszenzintensitäten auf, als die Zellen die nicht mit Trypsin behandelt wurden. Der Vergleich der Trypsin-behandelten Zellen untereinander zeigte, dass die Zellen, die auf Eis inkubiert wurden weit weniger fluoreszierten (Abbildung 42b).

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Dimer2Side-Aptamer von den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen internalisiert wurde.

#### **5.1.5.6 Bindung der AID-1-Variante Dimer2Side an Hyper-IL-6 mittels SPR-Spektroskopie**

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie konnte im Laufe dieser Arbeit die Wechselwirkung zwischen Aptameren und dem humanen IL-6-Rezeptor verifiziert werden. Im Gegensatz zu Filterretentionsstudien ermöglichte die Untersuchung der Bindungseigenschaften über die Plasmonresonanz nicht nur die Bestimmung der Bindungskonstante, sondern ebenfalls den Vergleich der Dissoziation der Aptamere vom Protein. Ein Unterschied der  $k_{\text{off}}$ -Werte, könnte Aufschluss darüber geben, weshalb das Aptamer Dimer2Side im Gegensatz zum Aptamer AID-1-T (5.1.4) an Zellen bindet, die den humanen IL-6R auf der Oberfläche tragen. Dazu wurde Hyper-IL-6 auf einem SPR-Chip immobilisiert und die Aptamere AID-1-T und Dimer2Side über den Chip geleitet. Die Änderung der Plasmonresonanz während des Probenauftrages, sowie während der anschließenden Dissoziation wurde detektiert (Abbildung 43).



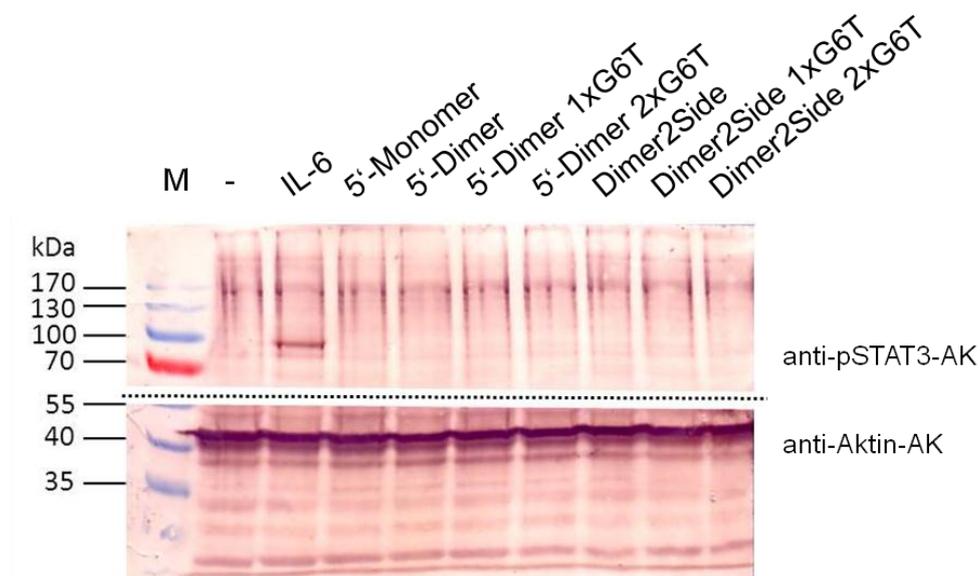
**Abbildung 43: Analyse der Interaktion der AID-1-Varianten AID-1-T und Dimer2Side mit Hyper-IL-6 über SPR-Spektroskopie.** Hyper-IL-6 wurde auf einem SPR-Chip (SierraSensors) über EDC-NHS immobilisiert und 50  $\mu\text{L}$  einer 1  $\mu\text{M}$  DNA-Aptamer-Lösung über den Chip geleitet (25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Im Anschluss an den Probenaufrags wurde die Flusszelle für 180 sek mit Selektionspuffer gewaschen. Die Bindung zwischen Protein und DNA wurde über die Änderung der Oberflächenplasmonresonanz detektiert, wobei die Resonanz in RU (Resonanz-Einheiten) gegen die Zeit aufgetragen wurde. ○ Dimer2Side, ○ AID-1-T-DNA.

Während des Probenaufrags der Aptamere AID-1-T bzw. Dimer2Side war in beiden Fällen ein Anstieg der Plasmonresonanz zu erkennen. Dies deutete auf die Bindung der Aptamere an Hyper-IL-6 hin. Im Anschluss wurde Selektionspuffer über den Chip geleitet und im Falle des Aptamers AID-1-T sank die Resonanz innerhalb von 360 Sekunden bis auf den Ausgangswert zurück. Innerhalb dieser Zeit dissoziierte das AID-1-T-Aptamer vollständig vom Protein. Bei Betrachtung des Aptamers Dimer2Side trat dies nicht ein. Nach Abschluss des Probenaufrags sank innerhalb der anschließenden 360 Sekunden die Resonanz von 30 RU auf 24 RU ab. Da die Signalstärke (RU) proportional zur gebundenen Masse ist, kann geschlossen werden, dass nach 360 Sekunden lediglich 20% des gebundenen Aptamers Dimer2Side vom Protein dissoziiert waren. Das Dimer2Side wies folglich im Vergleich zum ursprünglichen Aptamer AID-1 eine langsamere Dissoziationszeit vom Protein auf. Diese Tatsache könnte die Bindung des Dimer2Side an humane IL-6R-tragende Zellen begründen.

### 5.1.5.7 Einfluss der Dimere auf den IL-6-Signalweg

Es sind Rezeptoren bekannt, die über eine Multimerisierung auf der Zelloberfläche aktiviert werden, indem die entsprechende Signalkaskade induziert wird. Dollins *et al.* war es möglich, Zellen durch ein dimerisiertes OX40-Rezeptor-bindendes RNA-Aptamer zu stimulieren [96].

Ob eine Aptamer-induzierte Aktivierung des IL-6-Rezeptors ebenfalls durch die Bindung des Dimer2Side ausgelöst werden kann, lässt sich immunologisch durch Nachweis einer Phosphorylierung des Proteins STAT3 verfolgen. Dazu wurden Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen zur Entfernung des Zytokins IL-6 mehrmals gewaschen und mit dem Zytokin IL-3 stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 1  $\mu$ M der AID-1-DNA-Aptamer-Varianten 5'-Monomer, 5'-Dimer und Dimer2Side, sowie deren nicht-bindenden G6T-Varianten für zwei Stunden inkubiert. Außerdem wurden parallel Zellen mit dem Zytokin IL-6 stimuliert. Im Anschluss erfolgte der immunologische Nachweis des phosphorylierten STAT3 (pSTAT3) mittels Western-Blot (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Analyse einer Stimulation von Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen durch IL-6, die AID-1-T-Aptamer-Varianten 5'-Monomer, 5'-Dimer und Dimer2Side, sowie der nicht bindenden G6T-Varianten. Jeweils  $10^5$  Zellen wurden zur Entfernung von IL-6 gewaschen, in FKS-freiem Medium aufgenommen und mit IL-3 stimuliert. Die Aptamer-Varianten 5'-Monomer, 5'-Dimer, Dimer2Side und deren G6T-Varianten (1  $\mu$ M) wurden für zwei Stunden zu den Zellen gegeben. Die G6T-Varianten wiesen einen Basen-Austausch an 6. Position des AID-1-T-Aptamers auf, der zum Verlust der Bindung an IL-6R führte. Die geernteten Zellen wurden über SDS-Loading-Dye aufgeschlossen und die Proteine über eine 9%ige SDS-PAGE getrennt. Dabei diente die *Prestained Protein Ladder* (M) als Größenmaßstab. Der immunologische Nachweis von pSTAT3 (anti-pSTAT3-AK, oben) erfolgte über einen Western-Blot. Dabei wurde der Blot mittig durchtrennt (gestrichelter Linie), um auf dem unteren Teil die Kontrolle Aktin (anti-Aktin-Ak, unten) nachzuweisen. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion mit der am sek. AK konjugierten alkalischen Phosphatase.

Aktin ist ein ca. 42 kDa großes Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es diente als Ladekontrolle und konnte bei allen aufgetragenen Proben im gleichen Maße detektiert werden (Abbildung 44, unten). Aufgrund dessen ist der Vergleich anderer Protein-Banden untereinander zulässig. Phosphoryliertes STAT3 weist eine Größe von 90 kDa auf. Eine Bande dieser Größe ist lediglich bei der Stimulation mit IL-6 zu sehen. Alle anderen untersuchten Konstrukte führten nicht zur Phosphorylierung von STAT3 und somit offensichtlich nicht zur Stimulation des IL-6R auf Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen (Abbildung 44, oben).

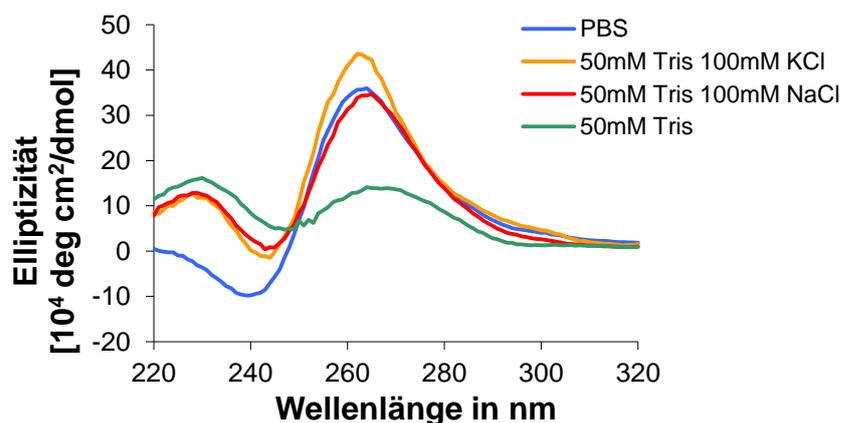
## 5.2 CHARAKTERISIERUNG VON IL-6R-SPEZIFISCHEN RNA-APTAMEREN

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde ein RNA-Aptamer untersucht, das spezifisch den hIL-6-Rezeptor bindet. Dieses 19-nt-kurze Aptamer AIR-3A wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ulrich Hahn selektiert und dessen hohe Affinität für den IL-6R gezeigt ( $K_d \approx 20$  nM) [57].

### 5.2.1 ANALYSE DER STRUKTUR DES RNA-APTAMERS AIR-3A ÜBER

#### ZIRKULARDICHROISMUS

Zunächst sollte die Struktur des RNA-Aptamers AIR-3A näher untersucht werden. Da die Sequenz von AIR-3A (5'-GGGGAGGCUGUGGUGAGGG-3') einen auffällig hohen Anteil an Guanin-Basen aufwies, wurde die Ausbildung einer von Guanin stabilisierten G-Quadruplex-Struktur angenommen. Die Ausbildung von G-Quadruplexen kann anhand des Zirkulardichroismus bestimmt werden, da diese Strukturen links und rechts polarisiertes Licht charakteristisch absorbieren. Zur Struktur-Aufklärung wurde AIR-3A in verschiedenen Puffern in An- und Abwesenheit monovalenter Kationen untersucht (Abbildung 45). Monovalente Kationen tragen erheblich zur Stabilität von G-Quadruplexen bei. Der Verlauf der resultierenden Absorptionskurve gibt zudem Aufschluss über die Anordnung der RNA-Stränge innerhalb des Quadruplexes (4.3.1).



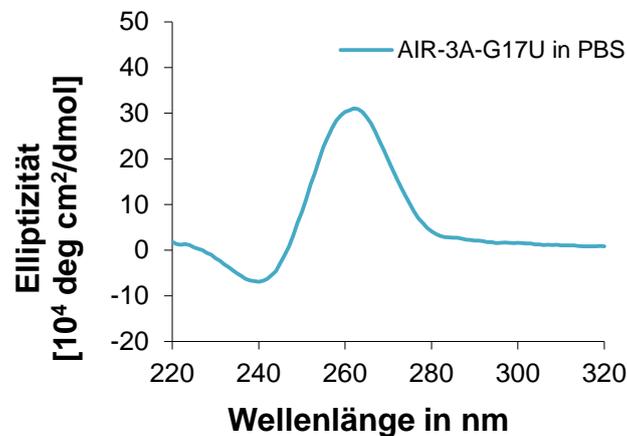
**Abbildung 45: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen des RNA-Aptamers AIR-3A in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems.** Das RNA-Aptamer (5  $\mu$ M) wurde in verschiedenen Puffern spektroskopisch in den Wellenlängen von 220 bis 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

In Abbildung 45 wurden die Ergebnisse der spektroskopischen CD-Messungen für AIR-3A graphisch dargestellt. Die Messung in PBS (Abbildung 45 blaue Kurve) zeigt ein negatives Minimum bei ca. 240 nm und ein positives Maximum bei ca. 264 nm auf. Dies

sind charakteristische Merkmale einer Quadruplex-Struktur mit paralleler intramolekularer Stranganordnung, d. h. einem Quadruplex indem die einzelnen RNA-Stränge parallel zueinander angeordnet sind. Der Kurvenverlauf des AIR-3A-Aptamers in Tris-Puffer ohne monovalente Kationen (Abbildung 45, grüne Kurve) zeigte hingegen nicht den für Quadruplex-Strukturen charakteristischen Verlauf.

Außerdem wurde eine nicht bindende Variante von AIR-3A (AIR-3A-G17U) untersucht, in der das 17. Nucleotid (Guanosin) gegen Uracil ausgetauscht wurde [97].

Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der CD-spektroskopischen Messungen von AIR-3A-G17U in PBS-Puffer.



**Abbildung 46: CD-spektroskopische Untersuchungen zur Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen der RNA-Aptamer-Variante AIR-3A-G17U in Abhängigkeit des gewählten Puffersystems.** Das RNA-Aptamer ( $5 \mu\text{M}$ ) wurde in verschiedenen Puffern von 220 bis 350 nm vermessen. Die Differenz des absorbierten links und rechts polarisierten Lichts (Elliptizität) wurde als Funktion der Wellenlänge graphisch dargestellt.

In PBS-Puffer wies auch AIR-3A-G17U alle wesentlichen Merkmale einer Quadruplex-Struktur auf (neg. Minimum bei ca. 240 nm und pos. Maximum bei ca. 264 nm). Die Quadruplex-Struktur wurde durch diesen Guanin-Austausch nicht zerstört.

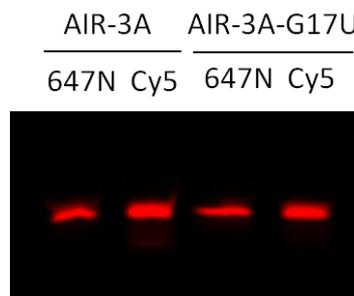
## 5.2.2 INTERAKTION ZWISCHEN DEM RNA-APTAMER AIR-3A UND IL-6-REZEPTOR-TRAGENDEN ZELLEN

Die Bindung des RNA-Aptamers-AIR-3A an Zellen, die den humanen IL-6-Rezeptor tragen, wurde durchflusszytometrisch analysiert.

### 5.2.2.1 Gelelektrophoretische Trennung fluoreszenzmarkierter RNAs

Zur Vorbereitung durchflusszytometrischer Analysen der Interaktion zwischen IL-6R-spezifischen Aptameren und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurden das Aptamer AIR-3A sowie die Variante AIR-3A-G17U am 5'-Ende mit Atto647N bzw. Cy5 modifiziert käuflich erworben. In Abbildung 47 ist eine gelelektrophoretische Analyse der fluoreszenzmarkierten RNAs dargestellt.

Das Gelbild zeigte für alle aufgetragenen fluoreszenzmarkierten RNAs eine fluoreszierende Bande gleicher Größe.

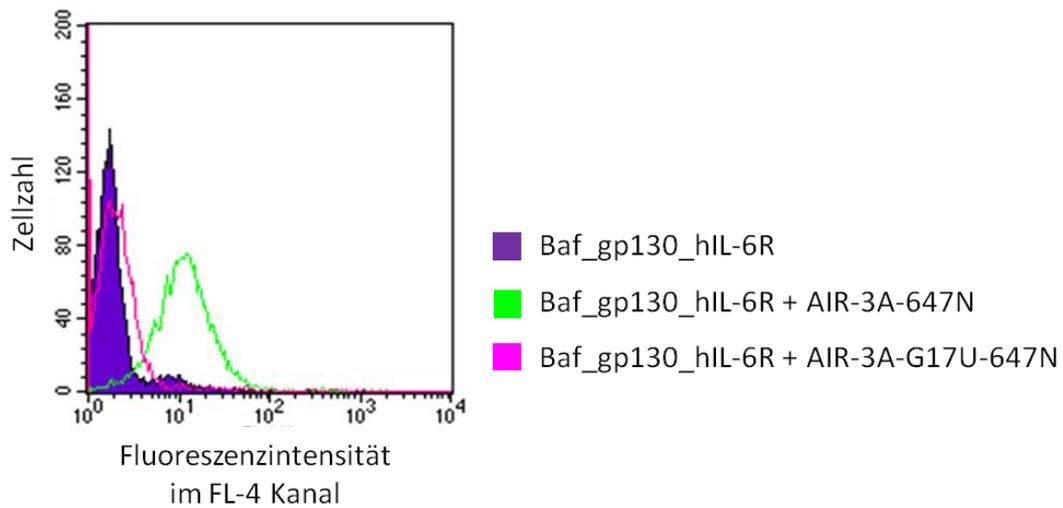


**Abbildung 47: Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung des AIR-3A-Aptamers und der Variante G17U.** RNA wurde am 5'-Ende mit Atto647N bzw. Cy5 markiert käuflich erworben und 5 pmol der RNA unter denaturierenden Bedingungen in einem 10%igen Gel elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad unter Verwendung eines Cy5-Filters.

### 5.2.2.2 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen

Bei Baf\_gp130\_hIL-6R handelte es sich um eine artifiziell hergestellte Zelllinie, die mit den Genen stabil transfiziert wurden, die den humanen IL-6-Rezeptor sowie gp130 kodieren. Nach Inkubation der Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen mit AIR-3A-647N bzw. dessen nicht bindende Variante AIR-3A-G17U647N wurden 10.000 Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Fluoreszenzintensität und damit auf ihre Interaktion mit den Ribonucleinsäuren untersucht. Die Abbildung 48 zeigt deutlich eine Bindung des Aptamers AIR-3A-647N an die Zellen, da es nach Bindung des AIR-3A-647N (Abbildung 48, grüne Linie) zu einer Verschiebung der Fluoreszenz zu höherer Intensität kam.

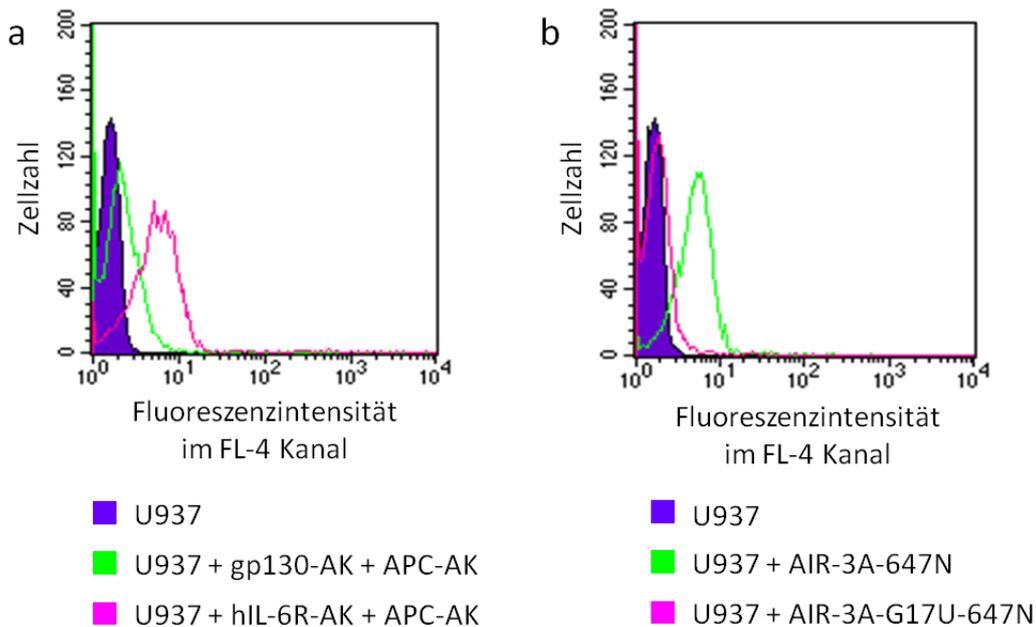
Hingegen führte die Inkubation mit der nicht bindenden AIR-3A-Variante G17U-647N (Abbildung 48, pinke Linie) zu keiner Verschiebung der Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 48: Bindung von AIR-3A-647N und der Variante AIR-3A-G17U647N an hIL-6-Rezeptor tragende Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit der jeweiligen fluoreszenzmarkierten RNA (28 nM) für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht. In Form eines Histogramm-Plots wurden die Ergebnisse dargestellt, wobei die Zellzahl gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurde. Die Fluoreszenzintensitäten der gebundenen RNAs wurden mit den unmarkierten Zellen verglichen.

### 5.2.2.3 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an U937-Zellen

Humane U937-Zellen tragen den IL-6-Rezeptor nativ auf der Zelloberfläche. Der IL-6-Rezeptor sowie der Signalüberträger gp130 sollten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen den IL-6R bzw. gp130 nachgewiesen werden. Ein fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper ermöglichte den durchflusszytometrischen Nachweis (Abbildung 49a).

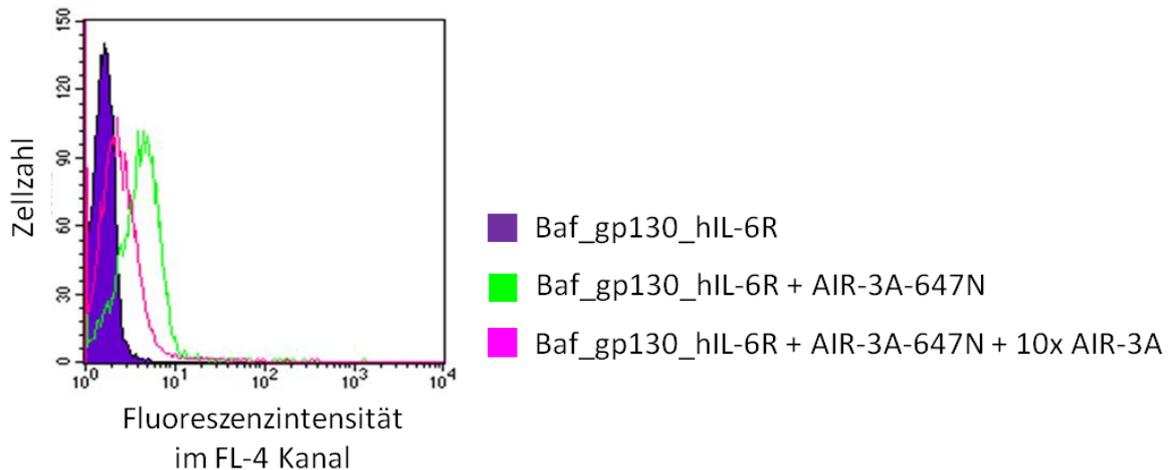


**Abbildung 49: Nachweis des hIL-6-Rezeptors und gp130 auf U937-Zellen (a) und Bindung des AIR-3A-Aptamers an U937-Zellen (b).** Es wurden je  $10^5$  Zellen mit den Antikörpern gegen IL-6R und gp130 für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss ein sekundär mit APC-fluoreszenzmarkierten anti-Ziege Antikörper zur Detektion der Primärantikörper verwendet (30 Minuten auf Eis) und durchflusszytometrisch untersucht (a). Dazu wurden  $10^5$  Zellen mit jeweils  $0,3 \mu\text{M}$  AIR-3A-647N und AIR-3A-G17U-647N für 30 Minuten auf Eis inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht (b). In Form eines Histogramm-Plots wurden die Ergebnisse dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

In Abbildung 49a ist die Detektion des IL-6R auf U937-Zellen unter Verwendung eines hIL-6R-spezifischen Antikörpers gezeigt (pinke Linie). Auch der gp130-spezifische Antikörper bewirkte eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität (grüne Linie), womit der Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche erbracht wurde.

Wurden U937-Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten AIR-3A-647N-Aptamer ( $0,3 \mu\text{M}$ ) inkubiert (Abbildung 49b, grüne Linie), konnte ebenfalls eine Interaktion mit den U937-Zellen festgestellt werden. Die Kontrolle AIR-3A-G17U-647N führte, wie erwartet, zu keiner Verschiebung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 49b, pinke Linie).

Die Spezifität der Aptamerbindung an U937-Zellen wurde bestimmt, indem zunächst fluoreszenzmarkiertes Aptamer an die Zellen gebunden wurde und im Anschluss unmarkiertes Aptamer kompetitiv in zehnfach molarem Überschuss hinzugegeben wurde. Dem Histogramm in Abbildung 50 ist zu entnehmen, dass der Zusatz von unmarkiertem AIR-3A zu einer verringerten Fluoreszenzintensität führte.



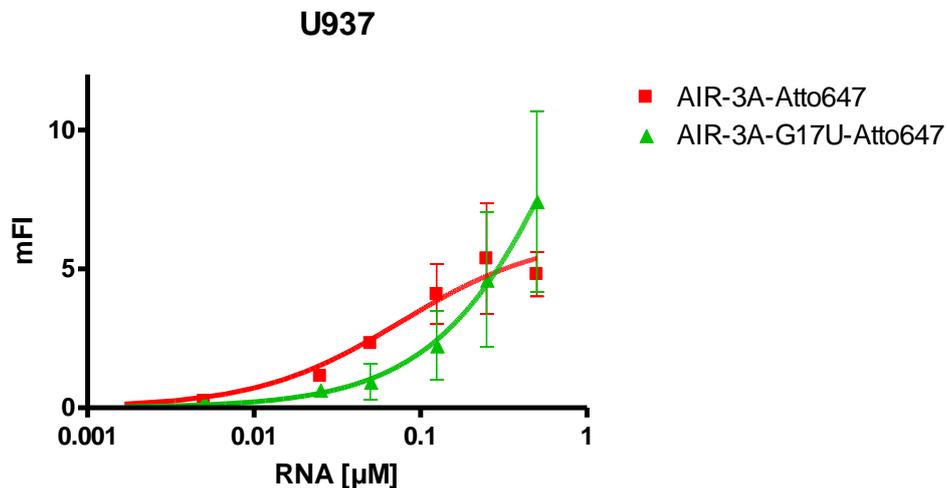
**Abbildung 50: Verdrängung von gebundenen AIR-3A-647N an U937-Zellen von unmarkierten AIR-3A.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit  $0,3 \mu\text{M}$  Aptamer für 30 Minuten auf Eis inkubiert und parallel anschließend unmarkiertes AIR-3A-Aptamer im 10-fachen Überschuss hinzugegeben. Die über Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse wurden in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

#### 5.2.2.4 Interaktion zwischen dem RNA-Aptamer AIR-3A und U937-Zellen

Die Bindung des IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers AIR-3A an U937-Zellen wurde durch Bestimmung des „pseudo- $K_d$ “ näher charakterisiert. Steigende Konzentrationen des Atto647N-markierten Aptamers AIR-3A wurden mit den Zielzellen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die RNA-Konzentrationen wurden gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten graphisch aufgetragen und die Dissoziationskonstante unter Voraussetzung eines *One-Site-Binding-Models* bestimmt (Abbildung 51).

Die graphische Darstellung der Ergebnisse für das AIR-3A-647N-Aptamer (Abbildung 51, rote Linie) zeigte, dass bei zunehmender Aptamer-Konzentration die mittlere Fluoreszenzintensität stieg, bis es zur Sättigung kam. Im Gegensatz zu AIR-3A erzeugen steigende Konzentrationen an G17U-647N einen fast linearen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 51, grüne Linie). Basierend auf den dargestellten Kurven konnten Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Für das Aptamer AIR-3A-

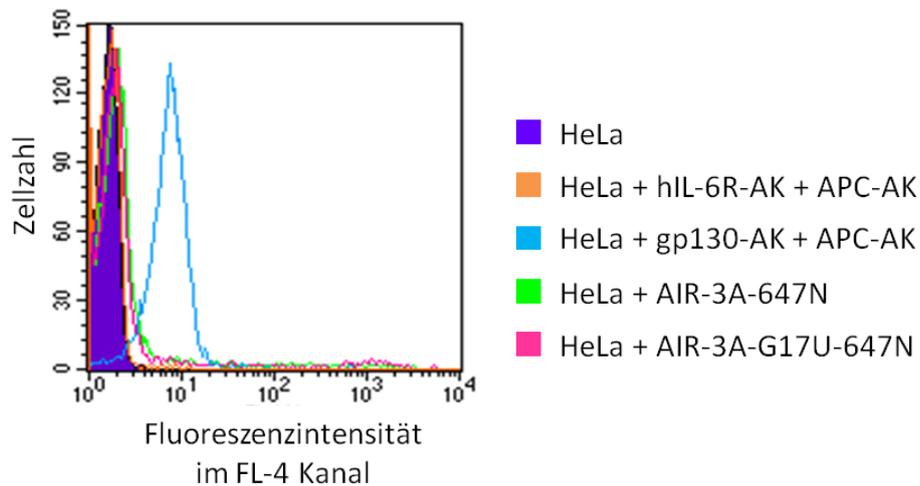
647N wurde ein  $K_d$ -Wert von  $0,077 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$  bestimmt. Dieser lag damit im selben Bereich, wie der Wert, der über Filterretentionsstudien für Hyper-IL-6 bestimmt wurde. Für G17U647N wurde ein  $K_d$ -Wert von  $1,1 \mu\text{M} \pm 2,0 \mu\text{M}$  bestimmt und war um das 14-fache schwächer als die Bindung des AIR-3A-Aptamers.



**Abbildung 51: Bestimmung eines „pseudo  $K_d$ “ für das IL-6R-bindende Aptamer an U937-Zellen.** Steigende Konzentrationen (0,03 – 0,5  $\mu\text{M}$ ) des IL-6R-bindenden Aptamers AIR-3A-647N (rot) sowie der nicht-bindenden Aptamer-Variante AIR-3A-G17U647N (grün) wurden an  $10^5$  U937-Zellen gebunden und durchflusszytometrisch analysiert. Aus drei unabhängigen Messungen wurden die RNA-Konzentrationen gegen die dazugehörigen mittleren Fluoreszenzintensitäten (mFI) graphisch dargestellt. Die Berechnung der Dissoziationskonstante erfolgte unter Verwendung des *One-Site-Binding-Models*.

### 5.2.2.5 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an HeLa-Zellen

HeLa-Zellen präsentieren den nativen IL-6-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Die Anzahl der hIL-6-Rezeptoren pro Zelle ist mit 50 bis 100 Rezeptoren sehr gering im Vergleich zu den U937- und den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen (siehe Tabelle 12). Zunächst wurde versucht, die hIL-6-Rezeptoren auf HeLa-Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe des hIL-6R-spezifischen Antikörpers nachzuweisen. Als Positivkontrolle diente wiederum ein anti-gp130-Antikörper (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Nachweis der hIL-6-Rezeptors auf HeLa-Zellen und Bindung des AIR-3A-Aptamers.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit den Antikörpern gegen den humanen IL-6R und gp130 für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss ein sekundärer mit APC-fluoreszenzmarkierter anti-Ziege Antikörper zur Detektion der Primärantikörper verwendet (30 Minuten auf Eis) und durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit jeweils  $0,3 \mu\text{M}$  AIR-3A-647N und AIR-3A-G17U-647N für 30 Minuten auf Eis inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. In Form eines Histogramm-Plots wurden die Ergebnisse dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Wie in Abbildung 52 dargestellt, konnte gp130 (grüne Linie), jedoch nicht der IL-6R (pinke Linie) auf den HeLa-Zellen immunologisch nachgewiesen werden. Die Inkubation der HeLa-Zellen mit dem AIR-3A-647N-Aptamer und dessen nicht-bindender Variante AIR-3A-G17U-647N führten ebenfalls zu keiner Bindung.

#### 5.2.2.6 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an HepG2-Zellen

Die Zelllinie HepG2, die ursprünglich einem Leberkarzinom entstammt, trägt den nativen IL-6R. In durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Aptamer AIR-3A-647N sowie dessen Variante G17U647N an HepG2-Zellen gebunden haben. Daraufhin wurde der fluoreszierende Farbstoff Atto647N gegen Cy5 ausgetauscht, um gegebenenfalls eine unspezifische Bindung aufgrund der Markierung auszuschließen. Auch dies führte zu einer Bindung beider RNAs. Unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung konnten sowohl AIR-3A als auch G17U an HepG2-Zellen binden. Die unspezifische Bindung konnte zudem nicht über eine vorherige Inkubation der Zellen mit tRNA behoben werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

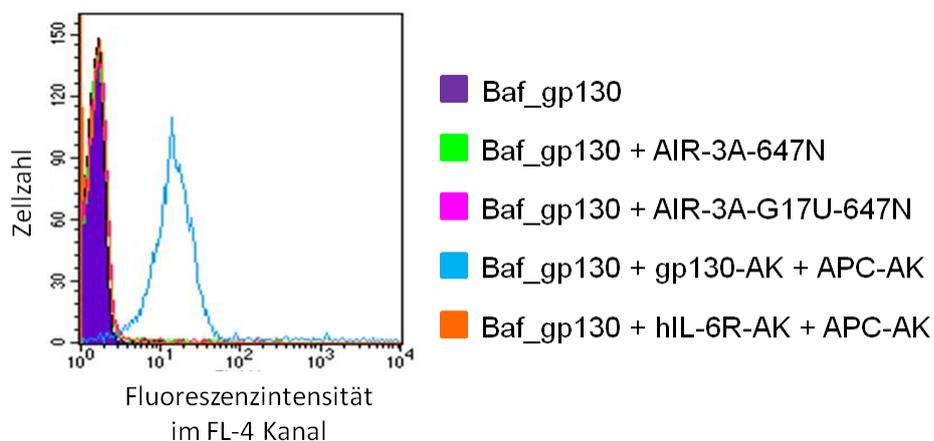
### 5.2.3 ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DEM RNA-APTAMER AIR-3A UND ZELLINIEN OHNE HUMANE IL-6-REZEPTOREN

Im Folgenden werden weitere Zelllinien untersucht, von denen bekanntermaßen kein humaner IL-6-Rezeptor auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

#### 5.2.3.1 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Baf\_gp130-Zellen

Die artifiziell-hergestellten Baf\_gp130-Zellen, tragen im Gegensatz zu den Baf\_gp130\_hIL-6R Zellen, nicht den hIL-6-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Sie stellen die Kontrollzellen dar, die zusätzlich gp130 präsentieren.

Um zu belegen, dass die Baf\_gp130-Zellen lediglich den gp130-Rezeptor und nicht den humanen IL-6-Rezeptor trugen, wurden die entsprechenden Antikörper für eine durchflusszytometrische Untersuchung herangezogen. Außerdem wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Aptameren AIR-3A-647N und AIR-3A-G17U-647N inkubiert und vermessen (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Baf\_gp130-Zellen ohne hIL-6-Rezeptor werden nicht vom Aptamer AIR-3A gebunden.** Je 10<sup>5</sup> Zellen wurden mit den Antikörpern gegen den humanen IL-6R und gp130 für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss ein sekundärer mit APC-fluoreszenzmarkierter anti-Ziege Antikörper zur Detektion der Primärantikörper verwendet (30 Minuten auf Eis) und durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden 10<sup>5</sup> Zellen mit hIL-6R-bindenden AIR-3A-647N und AIR-3A-G17U-647N (0,3 μM) für 30 Minuten auf Eis inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. In Form eines Histogramm-Plots wurden die Ergebnisse dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Wie in Abbildung 53 dargestellt, konnte gp130 (grüne Linie), jedoch nicht der IL-6R (pinke Linie) auf den Baf\_gp130-Zellen immunologisch nachgewiesen werden. Die Inkubation der Baf\_gp130-Zellen mit dem AIR-3A-647N und dessen nicht-bindender Variante AIR-3A-G17U-647N führten ebenfalls zu keiner Bindung.

### 5.2.3.2 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an Hek293-Zellen

Hek293-Zellen sind humanen Ursprungs, jedoch ohne natürliche Produktion von IL-6-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Die Bindung der Antikörper an die IL-6-Rezeptoren sowie gp130 und der fluoreszenzmarkierten Aptamere AIR-3A und dessen Variante G17U wurden durchflusszytometrisch untersucht.

Auf Hek293-Zellen konnte gp130 im Gegensatz zum IL-6R immunologisch nachgewiesen werden. Die Inkubation der Hek293-Zellen mit dem AIR-3A-647N-Aptamer und dessen nicht-bindender Variante AIR-3A-G17U-647N führten ebenfalls zu keiner Bindung (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 5.2.4 INTERNALISIERUNG DES RNA-APTAMERS AIR-3A IN IL-6-R-TRAGENDE ZELLEN

Rezeptoren unterliegen laufend zellulären Recycling-Prozessen, so auch der humane IL-6-Rezeptor [11, 12]. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass der Internalisierungsprozess des IL-6R von gp130 abhängig ist [12]. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Bindung des AIR-3A-Aptamers keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen dem humanen IL-6-Rezeptor und zum Zytokin Interleukin-6 oder zu gp130 hat [57]. Folglich ist anzunehmen, dass das Aptamer ebenfalls keinen Einfluss auf die Internalisierung des Rezeptors hat. Eine Möglichkeit, Internalisierungsprozesse nachzuweisen lag in der Verwendung fluoreszenzmarkierter Aptamere und einer durchflusszytometrischen Analyse.

Zellen werden zur Internalisierung angeregt, indem sie auf 37 °C erwärmt werden und ein Abkühlen der Zellen auf Eis hingegen unterbindet den Internalisierungsprozess. Zur Unterscheidung zwischen internalisiertem und außen gebundenem Aptamer musste das außen an den IL-6R-gebundene Aptamer von der Zelloberfläche entfernt werden. Dies wurde entweder enzymatisch über unspezifische Proteolyse der Zelloberflächenproteine mit Trypsin oder über enzymatische Degradation der RNA selbst bewerkstelligt.

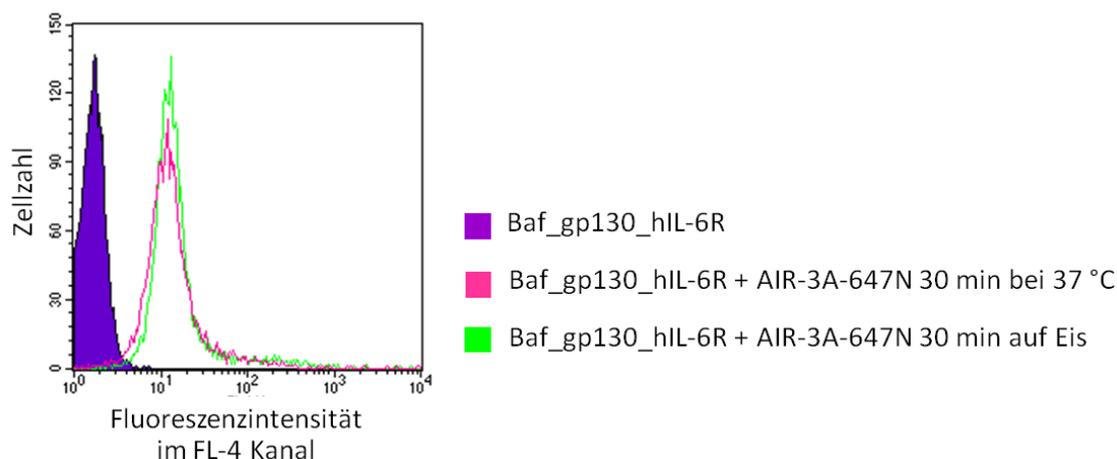
Werden nun Zellen vergleichend mit fluoreszenzmarkierten Aptamer bei 37 °C bzw. auf Eis inkubiert und anschließend das außen gebundene Aptamer entfernt, sollte die Inkubation bei den unterschiedlichen Temperaturen einen Unterschied der Fluoreszenzintensitäten bewirken. Ein Vergleich der Messungen ist jedoch nur unter der

Voraussetzung möglich, wenn die Inkubation der Zellen mit dem Aptamer gleicher Konzentration bei 37 °C und auf Eis dieselbe Fluoreszenzintensität zur Folge hat.

Die Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A wurde für Baf\_gp130\_hIL-6R- und U937-Zellen untersucht.

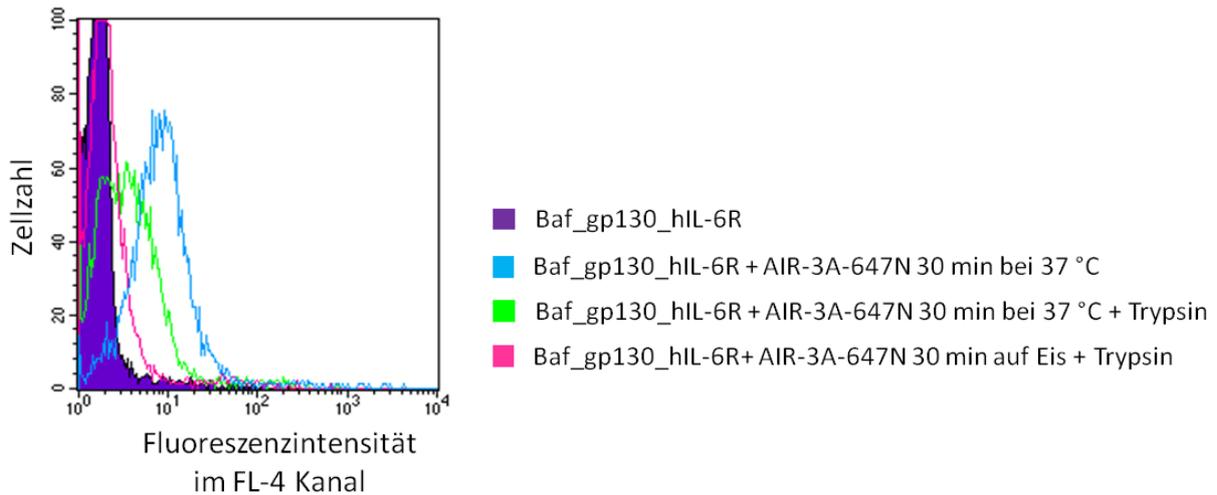
#### 5.2.4.1 Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen

Die spezifische Internalisierung des AIR-3A-Aptamers in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Zunächst erfolgte ein Vergleich der Bindung des Aptamers AIR-3A-647N an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen bei 37 °C und auf Eis ohne folgende enzymatische Behandlung (Abbildung 54). Die Inkubationen bei 37 °C (Abbildung 54, pinke Linie) bzw. auf Eis (Abbildung 54, grüne Linie) belegten eine temperatur-unabhängig Interaktion zwischen Aptamer und Zielzelle.



**Abbildung 54: Vergleich der Bindung des Aptamers AIR-3A-647N bei 37 °C und auf Eis.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit 28 nM Aptamer für 30 Minuten auf Eis und bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht und das Ergebnis in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

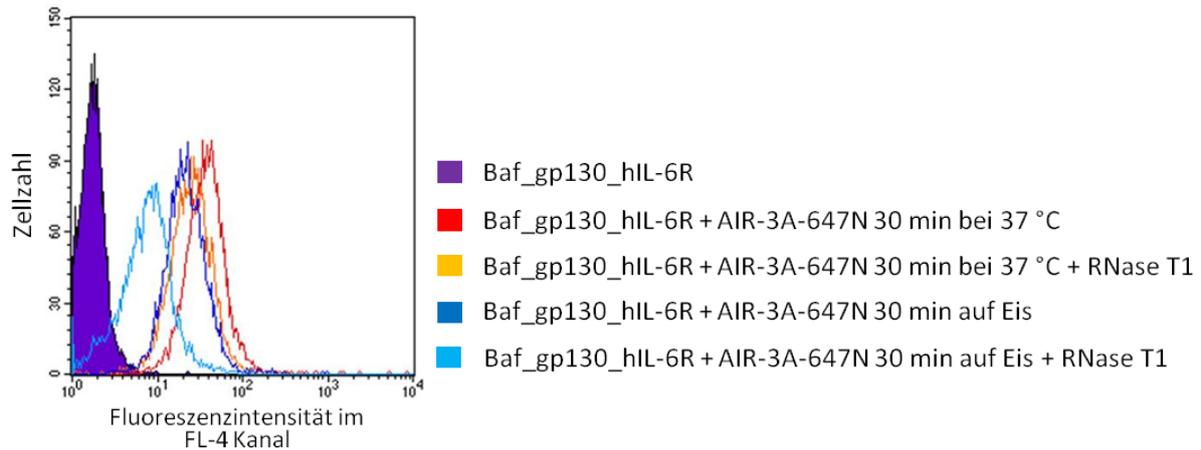
Aufgrund der temperaturunabhängigen Bindung des Aptamers AIR-3A-647N konnte die Internalisierung des Aptamers untersucht werden. Dazu wurden vergleichend drei Ansätze durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem AIR-3A-647N-Aptamer für 30 Minuten versetzt und ein Ansatz auf Eis und die anderen zwei bei 37 °C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde je ein Ansatz pro Temperatur einer Trypsin-Behandlung unterzogen. Anschließend wurden die nicht enzymatisch-behandelten Zellen, mit den enzymatisch-behandelten Zellen durchflusszytometrisch verglichen (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Internalisierung des Aptamers AIR-3A 647N in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit dem Aptamer AIR-3A-647N (28 nM) für 30 Minuten auf Eis und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde außen gebundenes Aptamer enzymatisch mittels Trypsin entfernt. Eine Internalisierung wird durch Temperaturerhöhung auf 37 °C initialisiert und unterbleibt bei Inkubation auf Eis. Die Internalisierung bei 37 °C wurde durch fluoreszierende Zellen nach Trypsin-Behandlung mittels Durchflusszytometrie bewiesen. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen zeigte, dass die nicht mit Trypsin behandelten Zellen, die höchste Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abbildung 55, blaue Linie). Trypsin-behandelte Zellen waren dagegen weniger fluoreszent, wobei die verbliebene Fluoreszenz bei 37 °C inkubierten Zellen (Abbildung 55, grüne Linie) im Vergleich zu den auf Eis inkubierten (Abbildung 55, pinke Linie) die Internalisierung in das Zellinnere belegten.

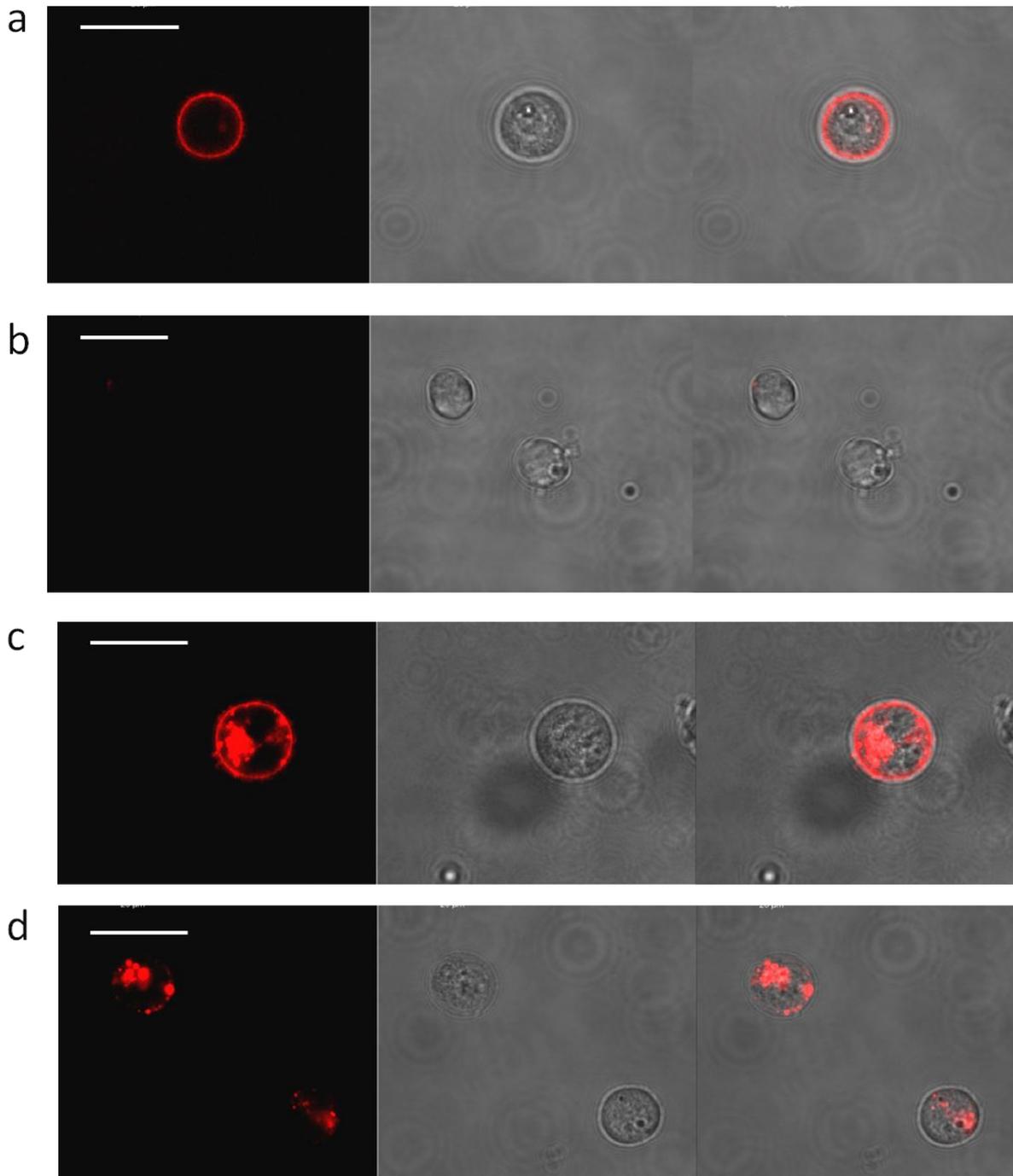
Eine weitere Möglichkeit das außen gebundene Aptamer zu entfernen, lag in der enzymatischen Degradation durch RNasen. Dazu wurde die RNase T1 verwendet, die einzelsträngige RNA spezifisch nach Guaninresten hydrolysiert. Es wurden vier Ansätze mit dem Aptamer AIR-3A-647N bei 37 °C und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde je ein Ansatz pro Temperatur mit RNase T1 versetzt und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.



**Abbildung 56: Internalisierung des Aptamers AIR-3A in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit dem Aptamer AIR-3A-647N (28 nM) für 30 Minuten auf Eis und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde außen gebundenes Aptamer mittels RNase T1 degradiert. Eine Internalisierung wird durch Temperaturerhöhung auf 37 °C initialisiert und unterbleibt bei Inkubation auf Eis. Die Internalisierung bei 37 °C wurde durch fluoreszente Zellen nach RNase-Behandlung mittels Durchflusszytometrie bewiesen. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Die Ergebnisse wurden in Abbildung 56 graphisch dargestellt. Die Interaktion der Aptamere mit nicht-enzymatisch-behandelten Zellen war temperaturabhängig (Abbildung 56, rote und blaue Linie), woraufhin die Internalisierung durch die enzymatisch-behandelten Zellen nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 56, orangene und hellblaue Linie).

Aus diesem Grund wurden diese Zellen mikroskopisch untersucht, um das fluoreszente Aptamer zu visualisieren. Die Verwendung eines konfokalen Mikroskops machte die Unterscheidung zwischen internalisierten und außen gebundenem Aptamer möglich. Dazu wurde ein Teil der durchflusszytometrisch untersuchten Zellen auf einen Objektträger übertragen, der sich am Aptamer befindliche Fluoreszenzfarbstoff Atto647N mit einem 633 nm Laser angeregt und die resultierende Fluoreszenz detektiert (Abbildung 57).



**Abbildung 57: Mikroskopische Visualisierung der Internalisierung des fluoreszenzmarkierten Aptamers AIR-3A in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Zellen wurden mit dem Aptamer AIR-3A-647N inkubiert. Die Inkubation fand für 30 Minuten auf Eis statt (a), mit einer anschließenden RNase-T1-Behandlung (b). Zur Initialisierung der Internalisierung fand die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C statt (c) und mit einer anschließenden RNase-T1-Behandlung wurden Aptamere an der Zelloberfläche entfernt (d). Die Fluoreszenz wurde mikroskopisch visualisiert (konfokal). Dargestellt sind die Emission bei 633 nm in Rot (links), Durchlicht (mittig) und Überlagerung beider Kanäle (rechts). Maßstab 20 µm (weiße Linie).

Zellen, die mit dem Aptamer AIR-3A-647N auf Eis inkubiert wurden, wiesen einen fluoreszierenden Ring um die Zelle auf (Abbildung 57a) und visualisierte die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Aptamere an der Zelloberfläche. Die enzymatische RNA-Degradation mittels RNase T1 führte dagegen zu nicht-fluoreszenten Zellen (Abbildung 57b).

Die Inkubation der Zellen bei 37 °C induzierte die Internalisierung und führte, neben an der Zelloberfläche gebundenen Aptameren, zusätzlich zur Translokation der Aptamere ins Zellinnere (Abbildung 57c). Die zusätzliche Behandlung mit RNase T1 führte zur Degradation der Aptamere an der Zelloberfläche (Abbildung 57d).

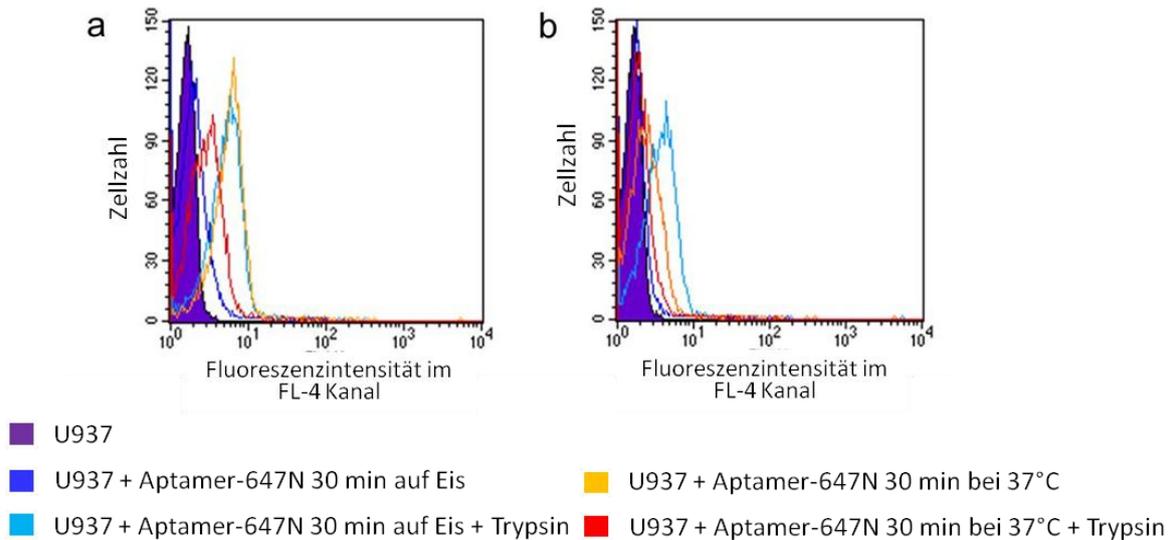
Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen, die über Durchflusszytometrie erbracht wurden. Das Aptamer AIR-3A-647N wurde nach Inkubation bei 37 °C internalisiert.

#### **5.2.4.2 Internalisierung des RNA-Aptamers AIR-3A in U937-Zellen**

Es galt zu zeigen, dass das Aptamer ebenfalls in Zellen transportiert wird, die den IL-6-Rezeptor nativ auf der Zelloberfläche tragen.

Die spezifische Bindung des AIR-3A-Aptamers an U937-Zellen wurde bereits gezeigt (Abbildung 58). Jedoch wurde auch gezeigt, dass die Aptamer-Variante AIR-3A-G17U ebenfalls an U937-Zellen bindet. Ob es sich bei dieser Aptamer-Variante um eine spezifische Bindung an den humanen IL-6-Rezeptor handelte, sollte darüber geklärt werden, ob das gebundene Aptamer ebenfalls in das Zellinnere transportiert wird.

Die Internalisierung der Aptamere in U937-Zellen wurde analog zu den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen über den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und anschließender Trypsin-Behandlung durchgeführt. Die resultierende Fluoreszenz wurde über Durchflusszytometrie detektiert und ist in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 58: Internalisierung des Aptamers AIR-3A und dessen Variante G17U in U937-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit 28 nM fluoreszenzmarkiertem Aptamer AIR-3A (a) oder der nicht-bindenden Variante AIR-3A-G17U (b) für 30 Minuten auf Eis und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde außen gebundenes Aptamer enzymatisch mittels Trypsin entfernt. Eine Internalisierung wird durch Temperaturerhöhung auf 37 °C initiiert und unterbleibt bei Inkubation auf Eis. Die Internalisierung bei 37 °C wurde für das AIR-3A-Aptamer durch fluoreszente Zellen nach Trypsin-Behandlung mittels Durchflusszytometrie bewiesen (a). AIR-3A-G17U wurde temperaturunabhängig nach der enzymatischen Behandlung von den Zellen entfernt (b). Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

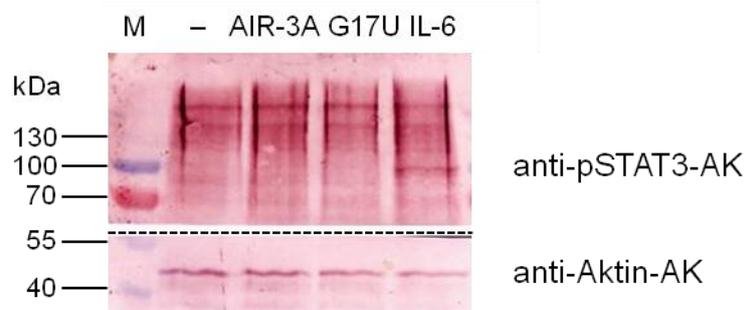
Das Aptamer AIR-3A-647N wurde bei 37 °C und auf Eis im gleichen Maße von den Zellen gebunden (Abbildung 58a, hellblaue und orangene Linie). Aufgrund der temperaturunabhängigen Interaktion des AIR-3A-Aptamers mit den U937-Zellen, wurden die Trypsin-behandelten Zellen betrachtet. Die bei 37 °C induzierte Internalisierung führte zu fluoreszenten Zellen trotz Enzymbehandlung (Abbildung 58a, rote Linie). Im Gegensatz dazu bewirkte die Enzymbehandlung der auf Eis inkubierten Zellen nahezu die vollständige Entfernung des Aptamers von der Zelloberfläche (Abbildung 58a, dunkelblaue Linie).

Die Atto647N-markierte AIR-3A-Variante AIR-3A-G17U wurde analog zum AIR-3A-647N-Aptamer untersucht. Die Interaktion der RNA mit den U937-Zellen war nicht temperaturunabhängig, da die Inkubation auf Eis eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität bewirkte, die stärker als die nach der Inkubation bei 37 °C war (Abbildung 58b, hellblaue und orangene Linie). Die enzymatische Entfernung der gebundenen RNA führte zum Verlust der Fluoreszenz in Falle der auf Eis als auch der bei 37 °C inkubierten Zellen (Abbildung 58b, dunkelblaue und rote Linie). Die Aptamer-Variante G17U wurde nicht in die U937-Zellen internalisiert.

### 5.2.5 EINFLUSS DER RNA-APTAMERE AUF DAS IL-6-SIGNALING

Im natürlichen IL-6-Signaling bewirkt die Bindung des Zytokins IL-6 u. a. die Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3). Diese kann immunologisch über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Interaktion des AIR-3A-Aptamers mit dem sIL-6R zeigte, dass die Bindung des Aptamers AIR-3A keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen dem humanen IL-6-Rezeptor und dem Zytokin IL-6 bzw. dem Signalüberträger gp130 hat [57]. Ob die Bindung des AIR-3A-Aptamers an humane IL-6-Rezeptor-tragende Zellen einen Einfluss auf das IL-6-Signaling hat, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Dazu wurden die Zelllinien U937 und HepG2 mit dem Aptamer AIR-3A sowie dessen nicht-bindende Variante AIR-3A-G17U in FKS-freien und -haltigem Medium sowie PBS-Puffer inkubiert. Zum Vergleich wurden zusätzlich unstimulierte und mit IL-6-stimulierte Zellen untersucht und die Phosphorylierung von STAT3 immunologisch in einem Western-Blot analysiert. Abbildung 59 zeigt, dass über einen anti-pSTAT3-AK pSTAT3 (90 kDa) in IL-6-stimulierten HepG2-Zellen nachgewiesen werden konnte. In unstimulierten als auch mit dem Aptamer AIR-3A oder AIR-3A-G17U inkubierten HepG2-Zellen konnte kein pSTAT3 nachgewiesen werden.



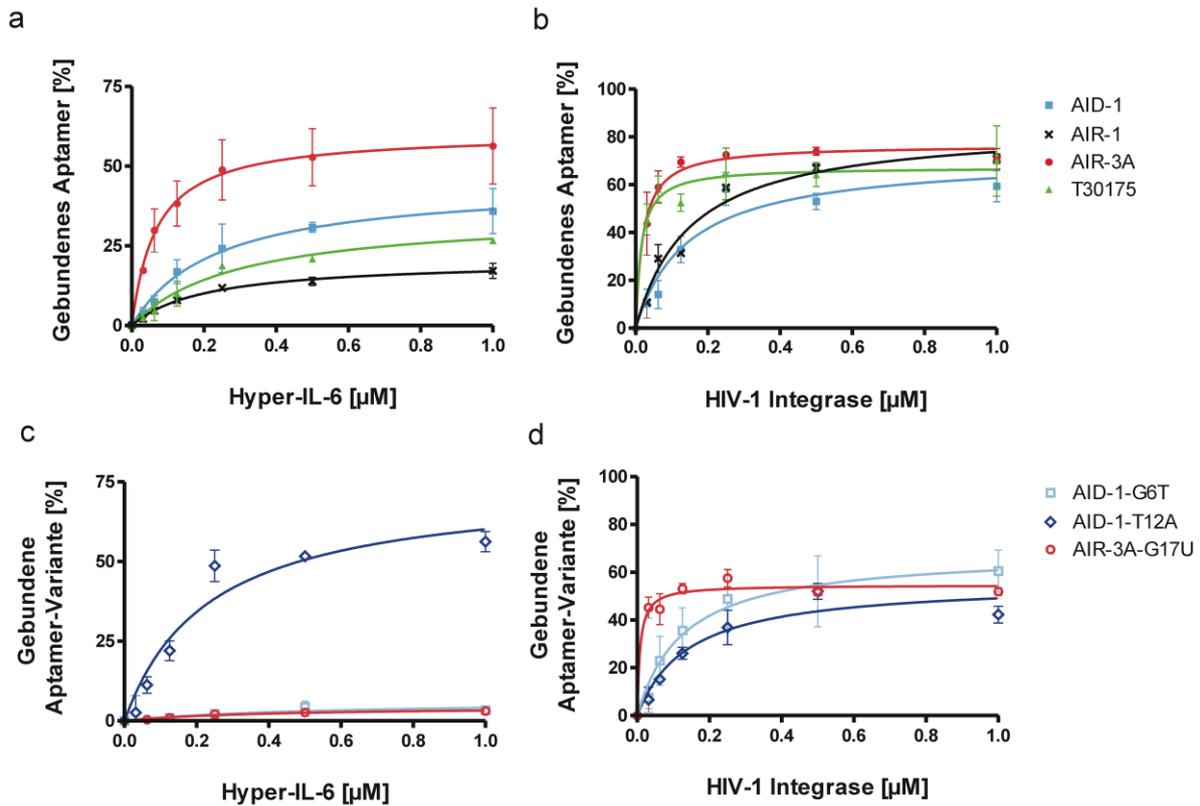
**Abbildung 59: Analyse einer Stimulation von HepG2-Zellen durch das Aptamer AIR-3A und dessen nicht-bindenden Variante AIR-3A-G17U.** Jeweils  $10^5$  Zellen wurden mit je 1 pmol des Aptamers für zwei Stunden zu den Zellen in FKS-freiem Medium inkubiert. Die anschließend geernteten Zellen wurden über SDS-Loading-Dye aufgeschlossen und die Proteine über eine 9%ige SDS-PAGE getrennt. Dabei diente der *Prestained Protein Ladder* (M) als Größenmaßstab. Der immunologische Nachweis von pSTAT3 (anti-pSTAT3-AK, oben) erfolgte über einen Western-Blot. Dabei wurde der Blot mittig durchtrennt (gestrichelter Linie), um auf dem unteren Teil die Ladekontrolle Aktin (anti-Aktin-AK, unten) nachzuweisen. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion mit der am sekundären AK konjugierten alkalischen Phosphatase.

Das Aptamer AIR-3A löst in HepG2-Zellen das IL-6-typische Signaling nicht aus. Dies war ebenfalls nicht in FKS-haltigem oder PBS-Puffer der Fall. Auch die Inkubation des Aptamers mit U937-Zellen führte zu keiner Stimulation (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 5.3 INTERAKTION VON IL-6R-BINDENDEN APTAMEREN UND DER HIV-1 INTEGRASE

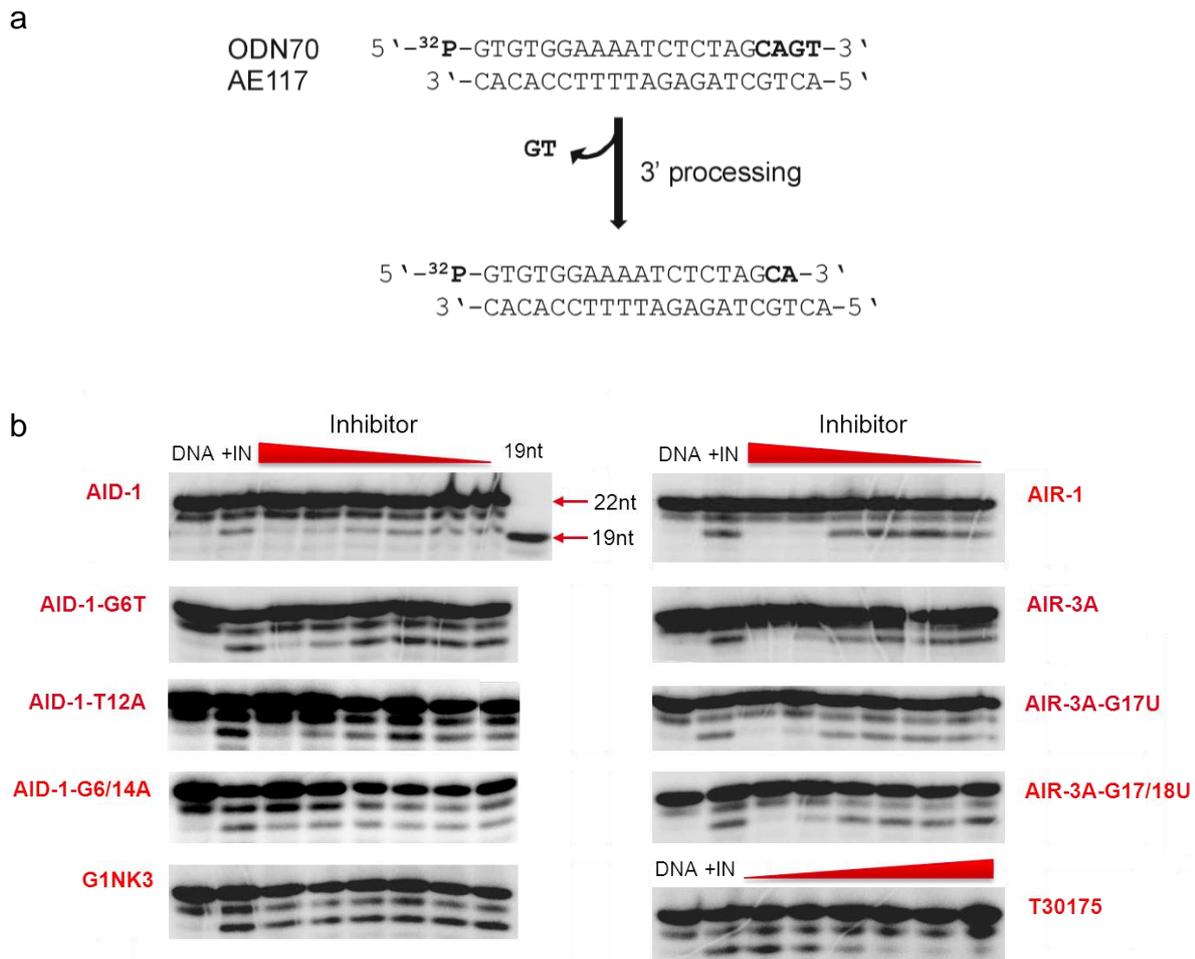
Das Aptamer AID-1 weist die identische Sequenz wie ein publizierter HIV-1 Integrase-Inhibitor auf. Folgend wurden IL-6R-bindende Aptamere sowie dessen Varianten auf die Interaktion mit der HIV-1 Integrase untersucht, um eine Variante zu identifizieren, die entweder nur den IL-6R bindet oder nur inhibitorisch auf die HIV-1 Integrase wirkt. Dazu wurden sowohl die IL-6R-bindenden Aptamere AID-1, AIR-1 sowie AIR-3A untersucht, als auch ausgewählte Varianten, die die Bindung zum IL-6R beibehielten (AID-1-G12T) oder verloren haben (AID-G6T, AID-1-G6/14A, G1NK3, AIR-3A-G17U, AIR-3A-G17/18U).

Um herauszufinden, ob die Interaktion der Aptamere mit den beiden Proteinen auf einem gemeinsamen Bindungsmotiv seitens des Proteins beruht, wurde zusätzlich ein bekannter HIV-Inhibitor auf die Bindung zum IL-6R untersucht. Die als T30175 bezeichnete unmodifizierte Variante des Inhibitors Zintevir weist die Sequenz 5'-GTGGTGGGTGGGTGGGT-3' auf. Diese verfügt über weitest gehende Homologie zum AID-1 (5'-GGGTGGGTGGGTGGGT-3') und bildet ebenfalls intrinsische G-Quadruplexe aus [89, 98]. Vergleichend wurden Bindungsstudien mit Hyper-IL-6 und der HIV-1 Integrase durchgeführt. Diese wurden zunächst in PBS durchgeführt, wobei die untersuchten Aptamere keine Bindung zur HIV-1 Integrase aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine Bindung konnte lediglich in einem Puffer beobachtet werden, der zusätzlich Reduktionsmittel wie DTT und Detergenzien enthielt (HIV-1 Integrase Bindepuffer, Tabelle 3). Folgend sind die Ergebnisse der Bindungsstudien gezeigt, die mit Hyper-IL-6 in PBS und mit der HIV-1 Integrase in "HIV-1 Integrase Bindepuffer" durchgeführt wurden. Den Ergebnissen (Abbildung 60, nicht für alle gezeigt) ist zu entnehmen, dass jedes IL-6R-bindende Aptamer sowie alle Varianten affin an die HIV-1 Integrase gebunden haben (Abbildung 60b und c). Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen im nano molaren Bereich (Tabelle 34). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Aptameren und deren jeweiligen Varianten festgestellt werden. Selbst die Varianten AID-1-G6/14A und G1NK3, die keine Quadruplex-Struktur ausbildeten, banden die Integrase. Neben allen Wildtyp-Aptameren band der HIV-Inhibitor T30175 ebenfalls Hyper-IL-6 und zwar im selben Maße wie AID-1 und AIR-1 mit einem  $K_d$ -Wert von 0,29  $\mu$ M (Tabelle 34).



**Abbildung 60: Interaktion von IL-6R-bindenden Aptameren sowie dessen Varianten mit Hyper-IL-6 und HIV-1 Integrase im Vergleich.** Steigende Konzentrationen (0 - 1 µM) von (a, c) Hyper-IL-6 oder (b, d) HIV-1 Integrase wurden mit radioaktiv markierten (a, b) Aptameren bzw. (c, d) Aptamer-Varianten in entsprechenden Puffern inkubiert. Zur graphischen Darstellung wurde der prozentuale Anteil des gebundenen Aptamers in Abhängigkeit der Protein-Konzentration halblogarithmisch unter der Verwendung der Software GraphPad Prism aufgetragen.

Um zu bestimmen, ob die Bindung zur HIV-1 Integrase ebenfalls mit einer Inhibition der Aktivität einhergeht, wurden mit den Aptameren sowie deren Varianten der inhibitorische Effekt auf das 3'-Processing der HIV-1 Integrase untersucht. Im Verlauf des 3'-Processings wird von einem Substrat (21-mer) am 3'-Ende ein Dinucleotid abgespalten (Abbildung 61). Durch radioaktive 5'-Markierung des Substrats konnten das 21-mer als auch das entstandene 19-mer elektrophoretisch getrennt werden. Die Anwesenheit von HIV-1 Integrase Inhibitoren verhinderte oder verminderte die Bildung des 19-mers. In Abbildung 61b sind die Einflüsse der Aptamere und deren Varianten auf das 3'-Processing zu sehen. Es wurde jeweils ein Ansatz ohne Enzym und ohne Inhibitor aufgetragen (DNA), in dem lediglich das 21-mer zu sehen ist. Der nächste Ansatz enthielt Enzym und keinen Inhibitor (+IN). Hier ist zusätzlich zum 21-mer das 19-mer Produkt zu sehen und entspricht dem maximalen Substrat-Umsatz. Anschließend wurden Aptamere in absteigender Konzentration zugesetzt (Inhibitor).



**Abbildung 61: 3'-Processing-Aktivität der HIV-1 Integrase und Inhibition mit IL-6R-bindenden Aptameren sowie deren Varianten.** (a) Zur Untersuchung der 3'-Processing-Aktivität der HIV-1 Integrase diente das <sup>32</sup>P-5'-endmarkierte 21-mer als Substrat, von dem am 3'-Ende ein Dinucleotid abgespalten wurde. Daraus resultierte ein 19-mer. (b) Für die Inhibition der 3'-Processing-Aktivität wurden steigende Konzentrationen der Aptamere (5 - 1230 nM) mit der Integrase prä-inkubiert und im Anschluss das Substrat hinzugegeben. Zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) wurde der Versuch ohne Integrase (DNA) sowie ohne Inhibitor und mit Integrase (+IN) durchgeführt und in einem 15% Gel elektrophoretisch getrennt.

Nach Quantifizierung der 3'-Processing-Produkte konnten mit den Ergebnissen IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden (Tabelle 34). Es zeigte sich, dass alle untersuchten Aptamere und deren Varianten inhibitorisch auf das 3'-Processing wirkten. Für die Wildtyp-Aptamere AID-1, AIR-1 und AIR-3A konnten IC<sub>50</sub>-Werte von 0,14 µM, 0,06 µM und 0,08 µM bestimmt werden. Die Einzelvarianten hingegen wiesen zwei bis sieben-fach höhere IC<sub>50</sub>-Werte auf. Varianten mit mehr als einem Basenaustausch (AID-1-G6/14A, G1NK3) inhibierten das 3'-Processing nicht mehr. AID-1-G6/14A und G1NK3 stellen Aptamer-Varianten dar, die, ihren CD-Profilen nach zu urteilen, keine Quadruplex-Struktur ausbilden. Ein Zusammenhang zwischen der Affinität und dem Maß an Inhibition konnte nicht beobachtet werden.

**Tabelle 34: Dissoziationskonstanten und IC<sub>50</sub>-Werte für ausgewählte IL-6R-Aptamere.** Aufgelistet sind  $K_d$ -Werte für IL-6R-Aptamere sowie Varianten mit Hyper-IL-6 und HIV-1 Integrase. Außerdem sind in der Tabelle die inhibitorische Wirkung der Aptamere auf die 3'-Processing-Aktivität der HIV-1 Integrase in Form von IC<sub>50</sub>-Werten dargestellt. Zusätzlich wurde die maximale Inhibition [%] der HIV-1 Integrase-Aktivität aufgeführt.

Oligonucleotide	Sequenz (5'-3')	Hyper- IL-6	HIV-1 Integrase	
		$K_d$ [ $\mu$ M]	$K_d$ [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
<b>AID-1</b>	d (GGGTGGGTGGGTGGGT)	0,22	0,14	0,14
<b>AID-1-G6T</b>	d (GGGTG <b>T</b> GTGGGTGGGT)	-	0,13	1,03
<b>AID-1-T12A</b>	d (GGGTGGGTGGG <b>A</b> GGGT)	0,23	0,07	0,36
<b>AID-1-G6/14A</b>	d (GGGTG <b>A</b> GTGGGTG <b>A</b> GT)	-	0,38	-
<b>G1NK3</b>	d (G <b>TTT</b> GTGT <b>TTT</b> GTGTGT)	-	0,14	-
<b>AIR-1</b>	r (GGGUGGGUGGGUGGGU)	0,21	0,13	0,06
<b>AIR-3A</b>	r (GGGGAGGCUGUGGUGAGGG)	0,07	0,02	0,08
<b>AIR-3A-G17U</b>	r (GGGGAGGCUGUGGUGA <b>U</b> GG)	-	0,008	0,27
<b>AIR-3A-G17/18U</b>	r (GGGGAGGCUGUGGUGA <b>UU</b> G)	-	0,06	0,24
<b>T30175</b>	d (GTGGTGGGTGGGTGGGT)	0,29	0,009	0,03

## 5.4 VERWENDUNG DER IL-6R-BINDENDEN APTAMERE ALS ZELLSPEZIFISCHE CARRIER

Rezeptor-spezifische Aptamere eröffnen die Möglichkeit diese als Carrier zu verwenden, um zellspezifisch bestimmte Substanzen mit in die Zelle zu transportieren [56]. Dabei bieten sich eine Vielzahl von einsetzbaren Substanzen an, die an das Aptamer geknüpft werden können. Beispielsweise würde der Einsatz von Toxinen zielgerichtet Zellen töten, die die humanen IL-6-Rezeptoren tragen oder durch die Verwendung von regulatorischen RNAs (siRNAs) könnten bestimmte Gene reguliert oder ausgeschaltet werden. Mit der Auswahl der zu verbindenden Substanz könnten gegebenenfalls Aussagen über den Mechanismus der Internalisierung getroffen werden oder der weitere Transport der internalisierten Substanzen innerhalb der Zelle untersucht werden.

Die IL-6R-bindenden Aptamere AIR-3A und Dimer2Side würden sich als solche Carrier eignen, da die spezifische Bindung an den humanen IL-6-Rezeptor auf Zelloberflächen und die Internalisierung beider Aptamere in das Zellinnere mit Hilfe von

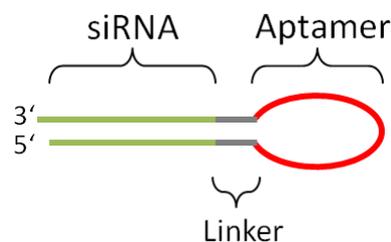
durchflusszytometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnte und dies zusätzlich mikroskopisch verifiziert wurde.

In dieser Arbeit wurde einerseits versucht, toxische oder fluoreszierende Proteine kovalent über die Verwendung von Crosslinkern mit dem RNA-Aptamer zu verbinden und andererseits das RNA-Aptamer mit siRNAs zu koppeln. Die Verknüpfung von Aptameren mit siRNAs wurde auf zwei Wegen angegangen: Herstellung von Aptamer-siRNA-Chimären und von Biotin-Streptavidin-Konjugaten.

#### 5.4.1 UNTERSUCHUNG VON APTAMER-SIRNA-CHIMÄREN

Das RNA-Aptamer AIR-3A sollte mit einer siRNA gekoppelt werden, die zur verminderten Produktion des Proteins PCSK9 führt. Die natürliche Funktion des Proteins PCSK9 liegt in der Bindung des LDL-Rezeptors, der zur Aufnahme des Cholesterins verantwortlich ist und führt zur Degradation des Rezeptors. Auf der Tatsache begründet, dass das AIR-3A-Aptamer eine RNA ist, wurde ein RNA-Strang über *in vitro* T7-Transkription hergestellt, der sich aus dem Aptamer und siRNA zusammensetzte. Die komplementären Basen der siRNA hybridisiert zu einem Doppelstrang, sollten eine Haarnadelstruktur ausbilden, die aus dem RNA-Aptamer-AIR-3A bestand (Abbildung 62).

Es war nicht möglich, die Aptamer-siRNA-Chimäre über *in vitro* T7-Transkription herzustellen. Die resultierenden Transkripte wiesen nicht die erwartete Größe auf, so dass es immer zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch kam (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 62: Darstellung einer Aptamer-siRNA-Chimäre.** Produkt nach T7-Transkription zur Erzeugung eines RNA-Stranges bestehend aus einer siRNA (grün), die über einen Loop zu einem Doppelstrang hybridisiert. Der Loop besteht aus den RNA-Aptamer-AIR-3A (rot) und verbindet die Stränge der siRNA über einen Linker (grau).

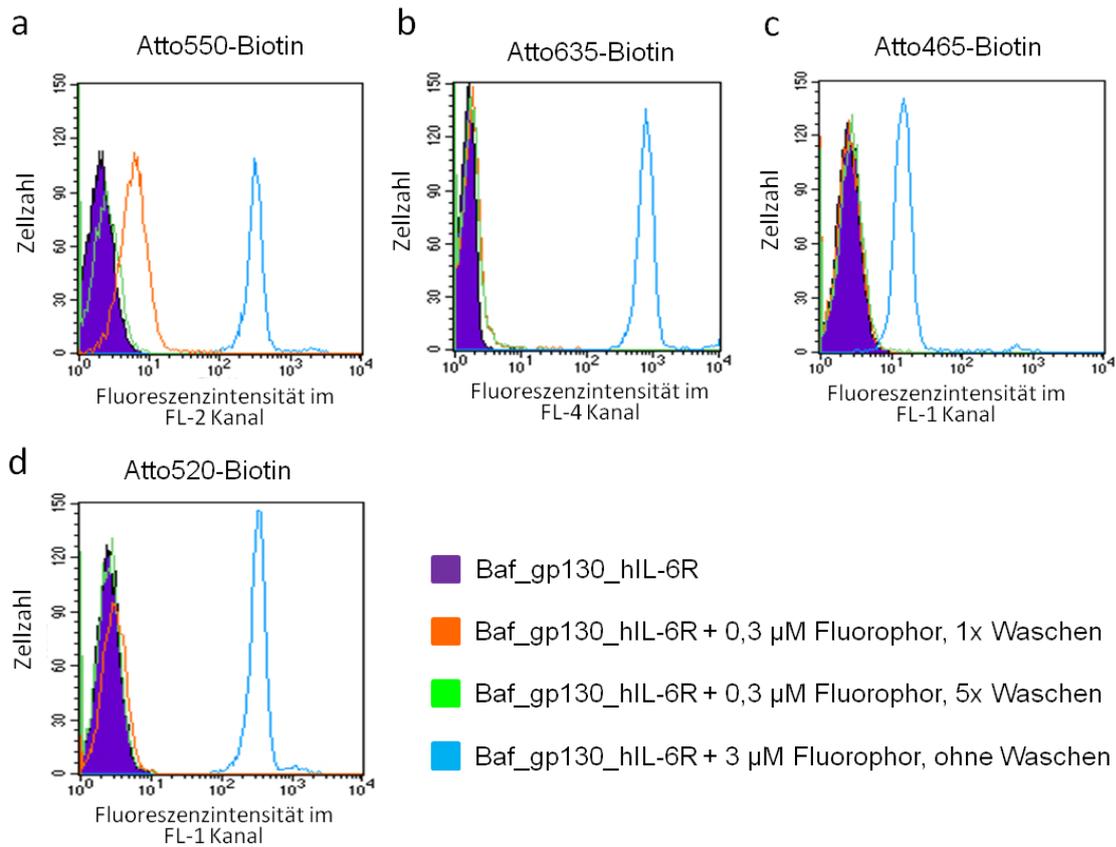
#### ***5.4.2 ANALYSE DER INTERAKTION VON APTAMER-STREPTAVIDIN-KONJUGATEN MIT IL-6R-TRAGENDE ZELLEN***

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, um ein Aptamer mit einer Substanz der Wahl zu verbinden. Eine besteht in der Konjugation über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion. Dabei binden biotinylierte Substanzen an eine der vier Streptavidin Untereinheiten und bilden darüber Tetramere aus.

Es musste der Beweis erbracht werden, dass ein Konjugat, das das Aptamer AIR-3A enthält, an die IL-6R-tragenden Zellen bindet und dass dieses Konjugat mit in das Innere der Zelle transportiert wird. Aus diesem Grund wurde als erstes ein Konjugat hergestellt, das neben dem AIR-3A-Aptamer ein Fluorophor trägt. Über durchflusszytometrische Untersuchungen sowie über eine mikroskopische Visualisierung sollte die Bindung als auch die Internalisierung in IL-6R-tragende Zellen gezeigt werden.

##### **5.4.2.1 Bestimmung des zu konjugierenden Fluorophors**

Zur Konjugation eines Aptamers mit einem Fluorophor, musste ein Fluorophor gewählt werden, welches möglichst keine unspezifische Interaktion mit den verwendeten Zellen aufwies. Dazu wurden vier verschiedene biotinylierte Atto-Farbstoffe untersucht, die zu den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen gegeben wurden. Außerdem wurden die Zellen nach der Inkubation entweder ein oder viermal mit Selektionspuffer gewaschen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Zur Verifizierung des verwendeten Detektionskanals wurden die Zellen mit einer sehr hohen Fluorophor-Konzentration inkubiert und anschließend ohne Waschschrift vermessen (Abbildung 63).



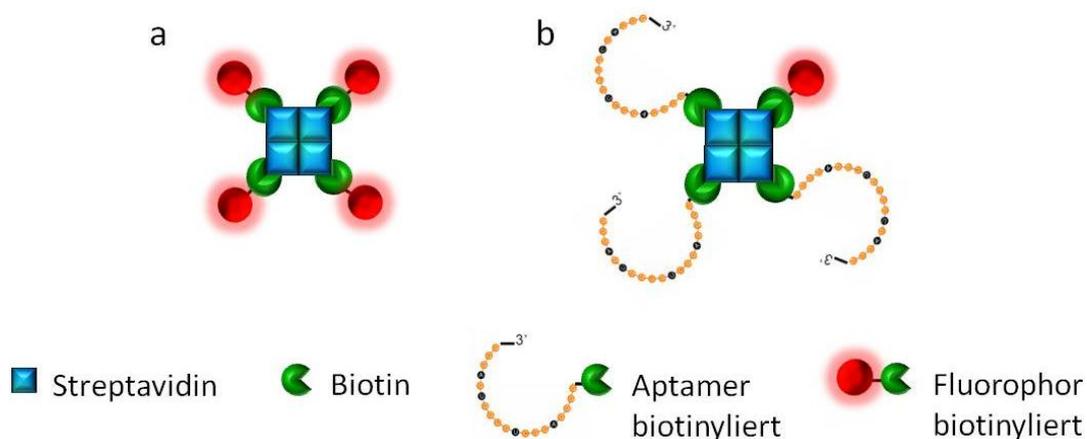
**Abbildung 63: Analyse von unspezifischen Interaktionen von biotinylierten Fluorophoren an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit  $0,3 \mu\text{M}$  oder  $3 \mu\text{M}$  des biotinylierten Fluorophors Atto550 (a), Atto635 (b), Atto465 (c) oder Atto520 (d) für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die mit  $0,3 \mu\text{M}$  Fluorophor inkubiert wurden, ein oder fünfmal mit Selektionspuffer gewaschen und die Zellen, die mit  $3 \mu\text{M}$  Fluorophor inkubiert wurden, gar nicht gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in den entsprechenden Kanälen durchflusszytometrisch untersucht und das Ergebnis in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Die Inkubation der Zellen mit dem Fluorophor Atto550 bewirkte nach einmaligem Waschen eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 63a, orange Linie). Diese Fluoreszenz verschwand jedoch nach fünf-maligem Waschen mit Selektionspuffer (Abbildung 63a, grüne Linie). Alle anderen untersuchten biotinylierten Fluorophore führten bei einer Konzentration von  $0,3 \mu\text{M}$  nicht zu einer unspezifischen Bindung (Abbildung 63b, c, d, orangene Linie). Anhand der hohen Fluorophor-Konzentration konnte für alle verwendeten Fluorophore eine signifikante Verschiebung der Fluoreszenzintensität detektiert werden und bestätigte die korrekte Verwendung der entsprechenden Kanäle, in denen die Analyse stattfand.

#### 5.4.2.2 Bindung und Internalisierung des Aptamer-Streptavidin-Fluorophor-Konjugats in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen

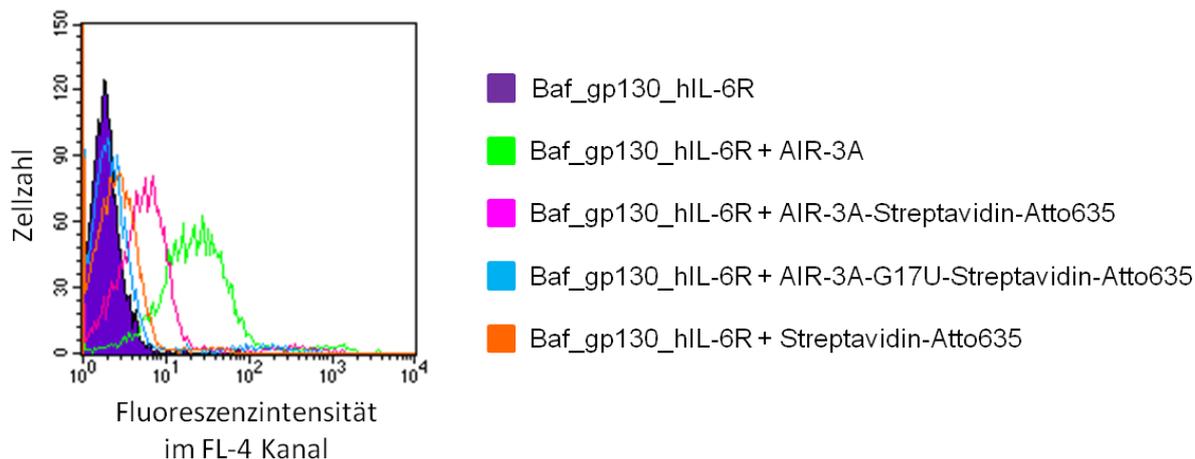
Aufgrund der Ergebnisse in 5.4.2.1 (Abbildung 63) standen die Fluorophore Atto465, Atto520 und Atto635 zur Auswahl, um diese mit dem Aptamer AIR-3A zu konjugieren. Erfahrungsgemäß weisen die meisten eukaryotischen Zelllinien eine durch UV-Licht ausgelöste Autofluoreszenz auf, die im grünen Spektralbereich zu detektieren ist. Da die Fluorophore Atto520 und Atto465 in diesem Licht emittieren, wurde für weitere Zwecke das Fluorophor Atto635 verwendet, das im Gegensatz zu den anderen Fluorophoren im roten Spektralbereich fluoresziert.

Zur Untersuchung der Interaktion des AIR-3A-Aptamers als Streptavidin-Konjugat mit IL-6R-tragenden Zellen, wurden drei verschiedene Streptavidin-Konjugate verwendet. Zum einen das AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugat, welches statistisch aus drei AIR-3A-Aptamer-Molekülen und einem Fluorophor zusammengesetzt war (Abbildung 64b) und ein Konjugat, das analog dazu aus der nicht-bindenden AIR-3A-Aptamer-Variante AIR-3A-G17U bestand (AIR-3A-G17U-Streptavidin-Atto635). Um zusätzlich eine unspezifische Bindung des Konjugats an die Zellen ausschließen zu können, wurde ein Konjugat bestehend aus Streptavidin und Atto635 untersucht (Abbildung 64a).



**Abbildung 64: Streptavidin-Konjugate bestehend aus Aptamer und Fluorophor.** Biotinyliertes Fluorophor an Streptavidin konjugiert (a) und biotinyliertes Fluorophor und Aptamer im statistischen Verhältnis 1:3 an Streptavidin konjugiert (b).

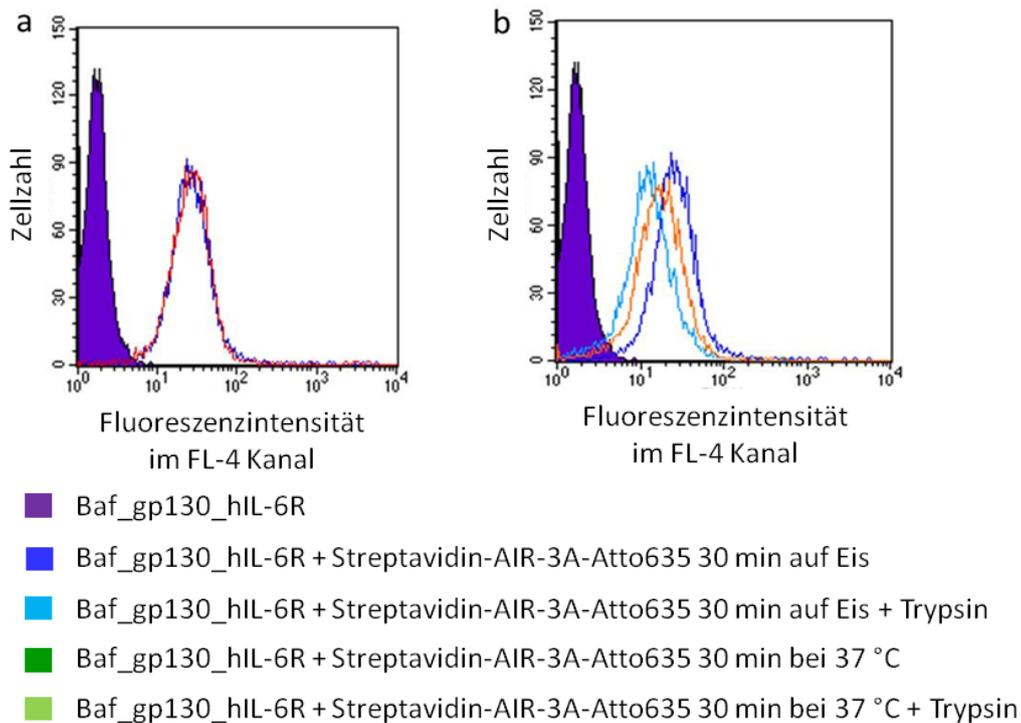
Die Bindung der drei Konjugate an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden 2  $\mu$ M der jeweiligen Konjugate für 30 Minuten auf Eis mit den Zellen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Analyse der Bindung des Aptamer-Streptavidin-Atto635-Konjugates an Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit  $2 \mu\text{M}$  der Konjugate für 30 Minuten auf Eis inkubiert. AIR-3A-Streptavidin-Atto635 setzte sich statistisch aus 3 IL-6R-bindenden AIR-3A-Aptameren und einem Fluorophor zusammen und analog dazu AIR-3A-G17U-Streptavidin-Atto635 mit der nicht-bindenden Aptamer-Variante AIR-3A-G17U. Das Konjugat Streptavidin-Atto635 diente als Kontrolle, sowie das fluoreszenzmarkierte AIR-3A-647N-Aptamer ( $0,3 \mu\text{M}$ , 30 min auf Eis). Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht und das Ergebnis in Form eines Histogramm-Plots dargestellt, wobei die gezählten Zellen gegen die detektierten Fluoreszenzintensitäten aufgetragen wurden.

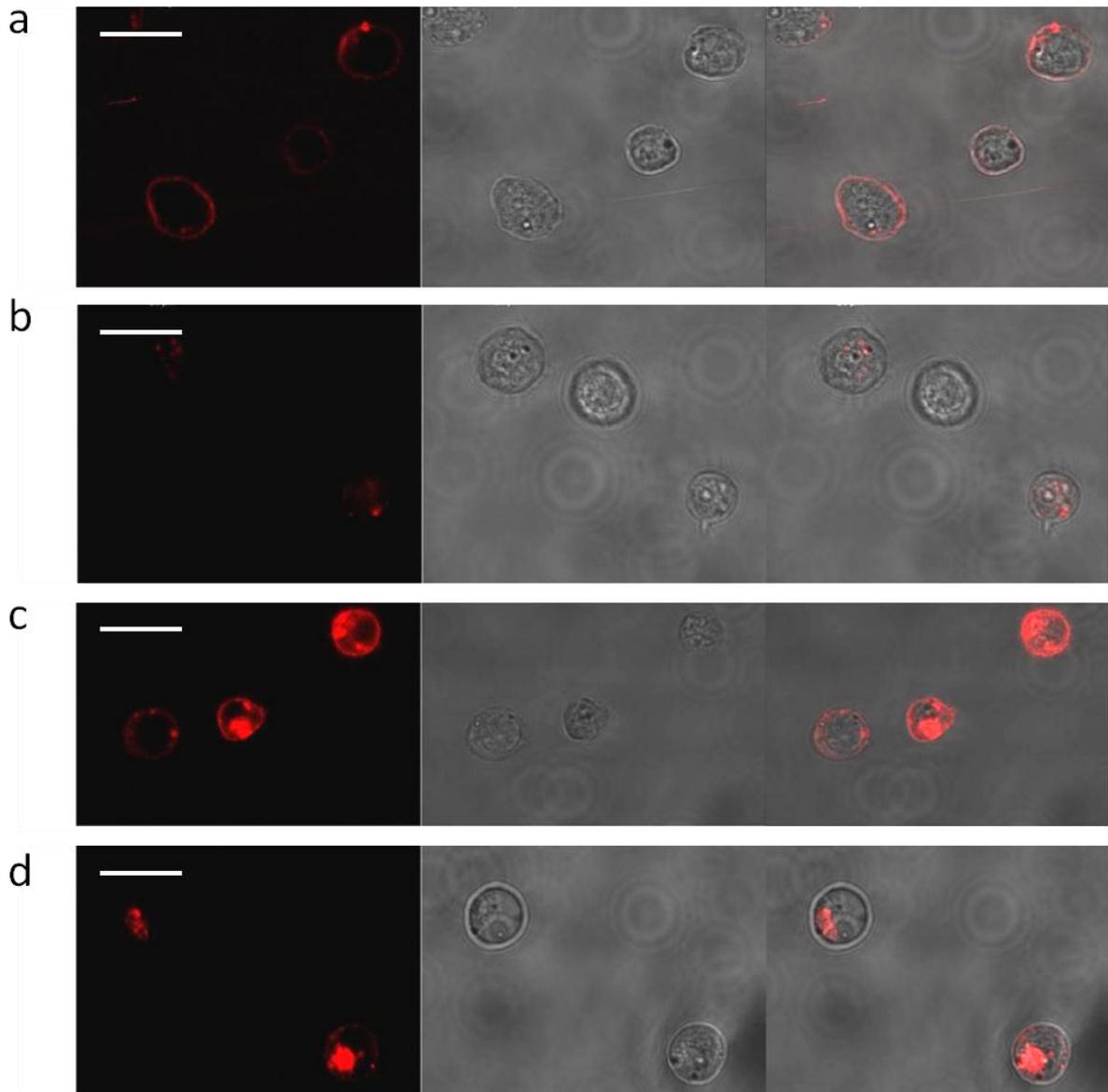
Zur Kontrolle dieser durchflusszytometrischen Untersuchung wurde das Aptamer AIR-3A-647N verwendet und zeigte eine Bindung an die Zellen hin (Abbildung 65, grüne Linie). Die Inkubation des AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugats führte ebenfalls zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität und deutete auf die Bindung dieses Konstrukts an die Zellen an (Abbildung 65, pinke Linie). Die Spezifität dieser Bindung wurde durch die Verwendung des gleichen Konjugats, jedoch mit der nicht-bindenden Variante AIR-3A-G17U deutlich, die als Konjugat nicht an die Zellen zu binden vermochte (Abbildung 65, blaue Linie). Eine unspezifische Bindung über das Fluorophor konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da das Streptavidin-Atto635-Konjugat ebenfalls keine Interaktion mit den Zellen zeigte (Abbildung 65, orangene Linie).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das AIR-3A-Aptamer als Streptavidin-Konjugat an IL-6R-tragende Zellen bindet, sollte untersucht werden, ob dieses Konjugat ebenfalls mit in die Zelle internalisiert wird. Dazu wurde die Internalisierung durch Temperaturerhöhung auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  induziert, von außen gebundenes Aptamer mit Trypsin entfernt und das Resultat mit Zellen verglichen, die auf Eis inkubiert wurden (Abbildung 66).



**Abbildung 66: Internalisierung der AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugate in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Je  $10^5$  Zellen wurden mit  $2 \mu\text{M}$  AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugat für 30 Minuten auf Eis und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde von außen gebundenes Aptamer enzymatisch über Trypsin entfernt. Eine Internalisierung wird durch Temperaturerhöhung auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  initialisiert und unterbleibt bei Inkubation auf Eis. Die Internalisierung bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde für das AIR-3A-Konjugat durch fluoreszente Zellen nach Trypsin-Behandlung mittels Durchflusszytometrie bewiesen. Dabei wurden die resultierenden Fluoreszenzintensitäten, die bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und auf Eis detektiert wurden, verglichen (a), um anschließend die mit Trypsin-behandelten Zellen vergleichen zu können (b).

Das AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugat zeigte keine temperaturunabhängige Interaktion mit den Baf\_gp130-IL-6R-Zellen (Abbildung 66a, rote und blaue Linie). Aufgrund dessen war der Vergleich der Trypsin-behandelten Zellen möglich (Abbildung 66b). Die Induzierung der Internalisierung bewirkte, dass diese Zellen nach der Trypsin-Behandlung immer noch fluoreszent waren. Die Inkubation auf Eis hingegen unterdrückte die Internalisierung und führte nach einer Trypsin-Behandlung zu wenig fluoreszenten Zellen. Um diese Internalisierung zu verifizieren, wurden diese durchflusszytometrischen Zellen mikroskopisch auf ihre Fluoreszenz hin untersucht (Abbildung 67).



**Abbildung 67: Internalisierung des AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugates in Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen.** Zellen wurden mit dem AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugat inkubiert ( $2 \mu\text{M}$ ). Die Inkubation fand für 30 Minuten auf Eis statt (a) und von außen gebundener Konjugate wurden enzymatisch über Trypsin entfernt (b). Die Internalisierung wurde durch Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  induziert und dazu das Konjugat bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 Minuten mit den Zellen inkubiert (c), mit einer anschließenden Trypsin-Behandlung wurden von außen gebundene Konjugate entfernt (d). Die Fluoreszenz wurde mikroskopisch visualisiert (konfokal). Dargestellt sind die Emission bei  $633 \text{ nm}$  (links), Durchlicht (mittig) und Überlagerung beider Kanäle (rechts). Maßstab (weiße Linie)  $20 \mu\text{m}$ .

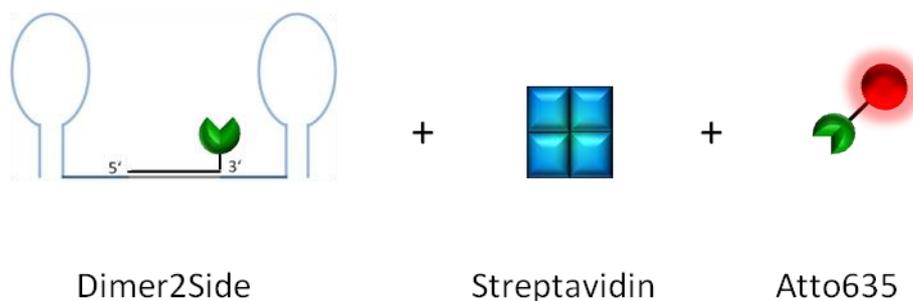
Über die konfokal-mikroskopische Untersuchung der Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen konnte die Bindung des AIR-3A-Streptavidin-Atto635-Konjugats visualisiert werden. Die Inkubation auf Eis zeigte die Lokalisation des Konjugates um die Zellen herum. (Abbildung 67a). Nach einer Trypsin-Behandlung verschwindet der fluoreszierende Ring (Abbildung 67b) und die Zellen verbleiben kaum fluoreszent.

Die Initialisierung der Internalisierung durch Inkubation bei 37 °C bewirkte die Translokation der Konjugate in das Zellinnere (Abbildung 67c). Der Unterschied zwischen internalisiertem und von außen gebundenem Konjugat wurde nach der Behandlung mit Trypsin deutlich. Der fluoreszierende Ring um die Zellen verschwand und es verblieb eine deutliche Fluoreszenz innerhalb der Zelle (Abbildung 67d).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen, die aus der durchflusszytometrischen Untersuchung gewonnen wurden und verifizieren, dass die Internalisierung des AIR-3A-Aptamers als Streptavidin-Konjugat mit einem Fluorophor zusammen in das Zellinnere von Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen erfolgte.

#### 5.4.2.3 Streptavidin-Konjugation mit dem DNA-Aptamer Dimer2Side

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Dimerisierung des DNA-Aptamers Dimer2Side dazu führte, dass das Aptamer in der Lage war, an humane IL-6R-tragende Zellen zu binden und mit in das Zellinnere transportiert zu werden (5.1.5.5). Es sollte analog zum AIR-3A-Aptamer ein Konjugat bestehend aus dem Dimer2Side, Streptavidin und biotinylierten Atto635 hergestellt werden (Abbildung 68) und die Interaktion mit Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen untersucht werden.

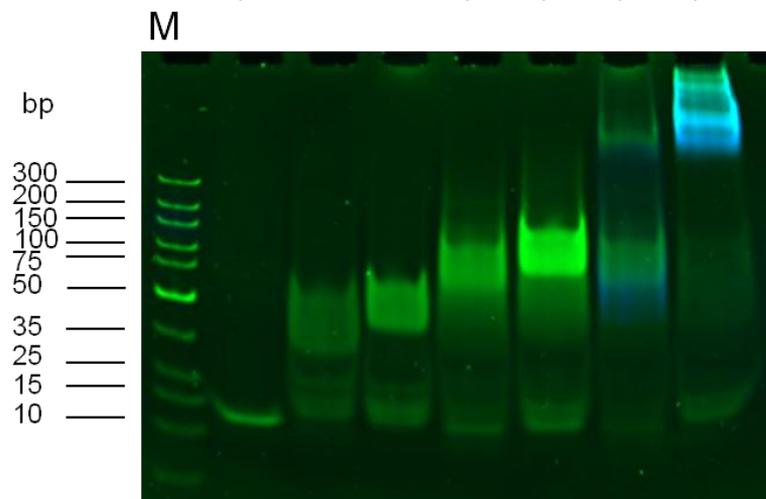


**Abbildung 68: Streptavidin-Konjugation mit dem Aptamer Dimer2Side.** Das Aptamer Dimer2Side wurde mit einer komplementären biotinylierten DNA hybridisiert und mit Atto635 über Streptavidin konjugiert, so dass statistisch je drei Dimere und ein Fluorophor konjugiert wurden. Gezeigt sind die einzelnen Komponenten der Konjugation.

Dazu wurde das Dimer2Side-Aptamer mit einer biotinylierten DNA hybridisiert und zusammen mit dem biotinylierten Fluorophor Atto635 und Streptavidin versetzt, so dass statistisch je drei Dimere und ein Fluorophor konjugiert wurden. Als Kontroll-Konjugat wurde eine Dimer2Side-Variante Dimer2Side 2xG6T verwendet, die pro Aptamer an der 6. Position einen Basen-Austausch aufwies, der zum Verlust der Bindung am hIL-6R führte (5.1.1). Die Konjugation der Komponenten wurde anschließend gelelektrophoretisch untersucht (Abbildung 69). Um die Konjugation mit dem

Fluorophor zu visualisieren, wurde im resultierenden Gel die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA als auch das fluoreszierende Atto635 detektiert und in verschiedenen Farben dargestellt. Die Übereinanderlagerung der beiden Bilder zeigte die Bildung des Konjugates, jedoch nur im Fall der Aptamer-Variante (Abbildung 69). Eine durchflusszytometrische und mikroskopische Untersuchung der Interaktion der Konjugate mit Baf\_gp130-hIL-6R-Zellen zeigte, dass keine Bindung an die Zellen auftrat (Ergebnisse nicht gezeigt).

Streptavidin	-	-	-	-	-	+	+
Dimer2Side	-	+	-	+	-	+	-
Dimer2Side 2xG6T	-	-	+	-	+	-	+
Atto635	-	-	-	-	-	+	+
G17T 3'-Biotin	+	-	-	+	+	+	+

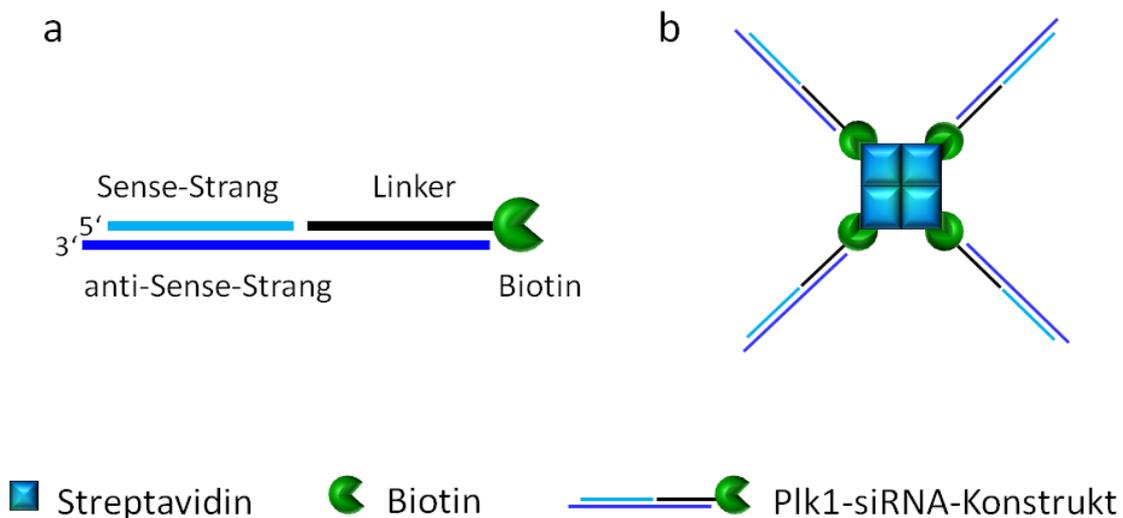


**Abbildung 69: Kontrolle der Hybridisierung und Konjugation mit dem Dimer2Side-Aptamer.** Auf einem 10%igen nativem PAA-Gel wurden Dimer2Side, sowie dessen nicht-bindende Variante 2xG6T und der Linker als Einzelstrang und aneinander hybridisiert aufgetragen. Durch die Hybridisierung an den Linker wurde das Aptamer biotinyliert und zusammen mit biotinylierten Atto635 und Streptavidin konjugiert. Das resultierende Gel wurde mit EtBr gefärbt. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad unter Verwendung eines Cy5- (blau) und EtBr-Filters (grün). Dargestellt ist die Übereinanderlagerung beider Kanäle.

#### 5.4.2.4 AIR-3A-Streptavidin-Konjugation mit siRNA gegen PLK1

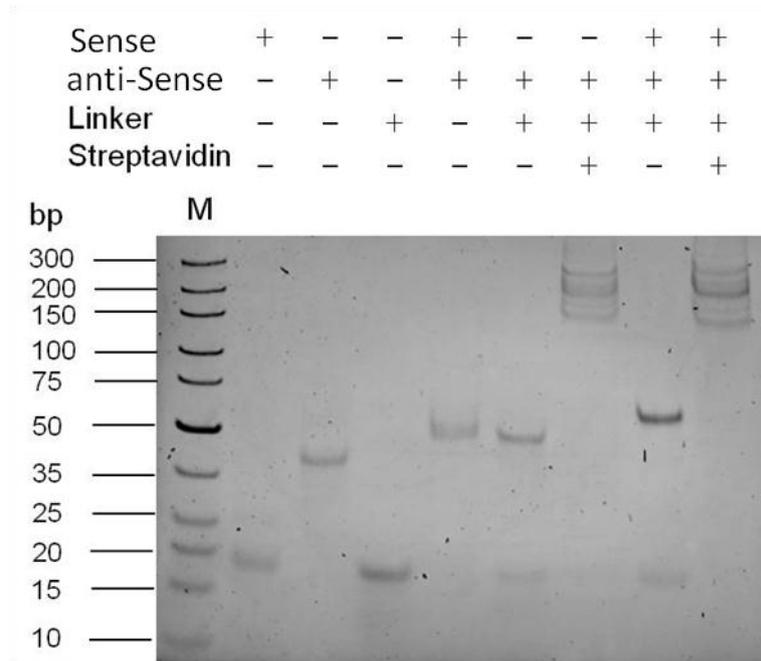
Es konnte gezeigt werden, dass das Konjugat bestehend aus dem AIR-3A-Aptamer und Streptavidin an humane IL-6R-tragende Zellen spezifisch gebunden hat und mit in das Zellinnere transportiert wurde (5.4.2.2). Aufgrund dessen sollte anstatt des Fluorophors eine siRNA in das Konjugat integriert werden.

Die verwendete siRNA diente zur Herunterregulation des Proteins PLK1 über den Mechanismus der RNA-Interferenz. PLK1 ist eine Kinase, die eine essentielle Rolle während der Mitose spielt. Zur Konjugation mit Streptavidin musste die siRNA biotinyliert vorliegen. Um einen schnellen und flexiblen Austausch von verschiedenen Nucleinsäuren zu gewährleisten, wurde eine biotinylierte DNA verwendet, an die verschiedene Nucleinsäuren hybridisiert werden konnten. In Abbildung 70 ist die biotinylierte DNA (Linker) zu sehen, die an den verlängerten anti-Sense-Strang der PLK1-siRNA hybridisiert wurde (dunkelblau). An den anti-Sense-Strang wiederum wurde der Sense-Strang der PLK1-siRNA hybridisiert (hellblau).



**Abbildung 70: Zusammensetzung des PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugats.** Der anti-Sense-Strang der PLK1-siRNA wurde am 5'-Ende verlängert, um eine Hybridisierung an einen biotinylierten Linker zu gewährleisten. Der Sense-Strang der PLK1-siRNA hybridisierte an das 3'-Ende des anti-Sense-Stranges (a, Sequenzen siehe Tabelle 6). Die Zugabe von Streptavidin führte zur Konjugation der biotinylierten PLK1-siRNA, die zur Bildung von Tetrameren PLK1-siRNA-Konstrukten führte (b).

Der anti-Sense und der Sense-Strang wurden über *in vitro* T7-Transkription hergestellt und in einem 10%igen nativen PAA-Gel die Hybridisierung der drei Nucleinsäure-Stränge sowie die Konjugation mit Streptavidin überprüft (Abbildung 71).

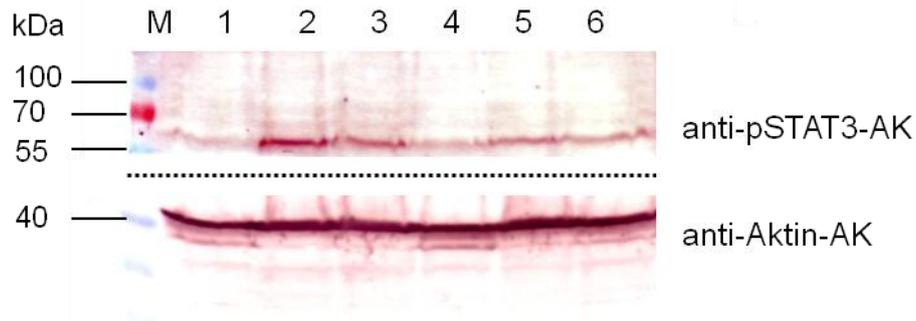


**Abbildung 71: Kontrolle der Hybridisierung und Konjugation der PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugate.** In einem 10%igen nativen PAA-Gel wurden der biotinylierte Linker (23 nt), sowie die PLK1-siRNA-Stränge Sense- (21 nt) und anti-Sense-Strang (50 nt) einzeln, aneinander hybridisiert und mit Streptavidin konjugiert, aufgetragen. Als Größenstandard wurde der DNA *Low Range Ladder* (M) aufgetragen. Die Detektion der Ethidiumbromid-gefärbten Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad. Durchgeführt von Frau Wasiljew.

Dem Gel ist zu entnehmen, dass die T7-Transkription des Guide und Sense-Stranges zu distinkten Banden gewünschter Größe geführt hat. Desweiteren führten die Hybridisierungen der anti-Sense/Sense-, anti-Sense/Linker- und anti-Sense/Sense/Linker-Stränge zu konkreten Banden, die entsprechend ihrer Größe in der gelelektrophoretischen Trennung ein langsames Laufverhalten zeigten. Die Zugabe von Streptavidin führte zu Konjugaten verschiedener Größe.

#### 5.4.2.5 Transfektion von U937-Zellen mit PLK1-siRNA und dem PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat

Um die Funktionalität der PLK1-siRNA zu verifizieren wurden U937-Zellen mit 20 pmol des biotinylierten PLK1-siRNA-Konstrukts (Abbildung 70a) und dem PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat (Abbildung 70b) transfiziert. Die Zellen wurden nach der erfolgten Transfektion für einen und zwei Tage kultiviert und anschließend das Protein PLK1 immunologisch über eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 72). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden zudem Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für das Grünfluoreszierende-Protein (GFP) codierte. Nach einem Tag wurde per Mikroskop der Anteil der fluoreszierenden Zellen mit 80% bestimmt.



**Abbildung 72: Funktionalität der biotinylierten PLK1-siRNA selbst und als Streptavidin-Konjugat in U937-Zellen.** Jeweils  $10^6$  U937-Zellen wurden mit je 20 pmol PLK1-siRNA und PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat transfiziert und für einen und zwei Tage inkubiert. Die geernteten Zellen wurden über SDS-Loading-Dye aufgeschlossen und die Proteine über eine 12% SDS-PAGE getrennt. Der immunologische Nachweis von PLK1 (anti-PLK1-AK, oben) erfolgte über einen Western Blot. Dabei wurde der Blot mittig durchtrennt (gestrichelter Linie), um auf dem unteren Teil die Ladekontrolle Aktin (anti-Aktin-Ak, unten) nachzuweisen. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion der konjugierten alkalischen Phosphatase am sek. AK. Aufgetragen wurden der *Prestained Protein Ladder* (M), unbehandelte U937-Zellen (1), transfizierte Zellen ohne RNA-Zugabe (1), Zellen mit PLK1-siRNA transfiziert und nach einem (3) oder zwei Tagen (4) geerntet, Zellen mit PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat transfiziert und nach einem (5) oder zwei Tagen geerntet (6).

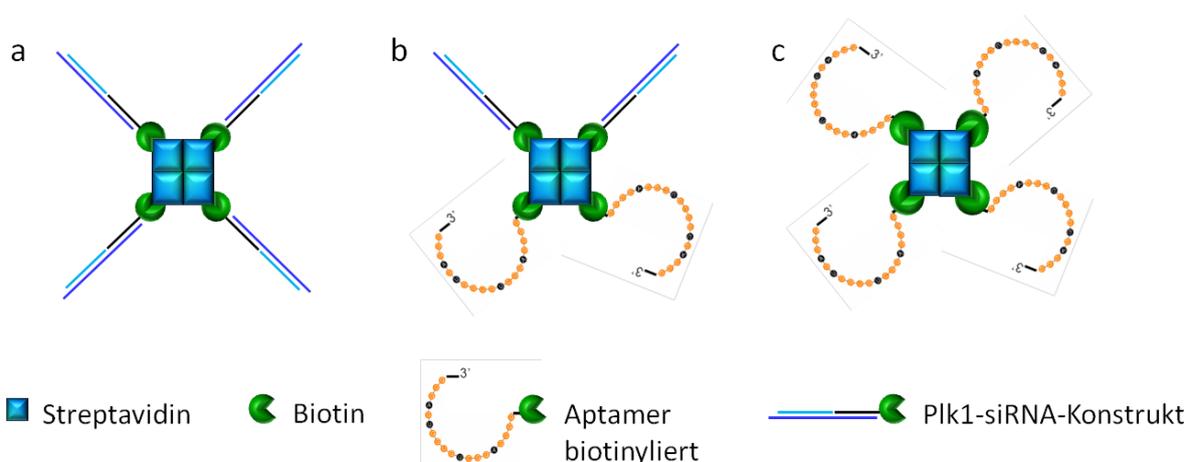
Die Transfektion von U937-Zellen mit der PLK1-siRNA sollte zur Herunterregulierung des PLK1-Proteins führen. Dies sollte in einer Western-Blot-Analyse anhand eines Unterschieds bezüglich der detektierten Bandenstärke für PLK1 zu sehen sein. Der Vergleich der verschiedenen Ansätze untereinander ist unter der Voraussetzung gewährleistet, wenn gleiche Mengen an Zellen analysiert werden. Als sogenannte Ladekontrolle wurde die untere Hälfte des Western-Blots abgetrennt und das 42 kDa große Strukturprotein Aktin immunologisch nachgewiesen. Aktin wurde in allen Proben im gleichen Maße detektiert und lässt den Vergleich der Banden, die mit dem PLK1-Antikörper detektiert wurden, zu (Abbildung 72).

Das PLK1-Protein ist ein 68 kDa großes Protein und konnte in unbehandelten U937-Zellen (Abbildung 72, Spur 1) kaum detektiert werden. Hingegen in den Zellen, die der Transfektion unterzogen wurden, war eine PLK1entsprechend große Bande zu sehen. Folgend wurden nur die Proben miteinander verglichen, die unter denselben Bedingungen behandelt wurden und zwar alle Zellen, die der Transfektion unterzogen wurden. Zellen, die mit der biotinylierten PLK1-siRNA transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Herunterregulation von PLK1, im Vergleich zu den Zellen, die ohne RNA transfiziert wurden, . Darüber hinaus führte die zweitägige Kultivierung post-transfektionale zu einer verstärkten PLK1-Protein-Verminderung (Abbildung 72, Spuren 3 und 4). Außerdem wurden Zellen mit der biotinylierten PLK1-siRNA als Streptavidin-Konjugat transfiziert. Der Vergleich der resultierenden PLK1-Banden im Western Blot

(Abbildung 72, Spuren 5 und 6) mit denen, die ohne RNA transfiziert wurden, zeigte, dass PLK1 durch das Konjugat ebenfalls herunterreguliert wurde (Abbildung 72, Spur 2).

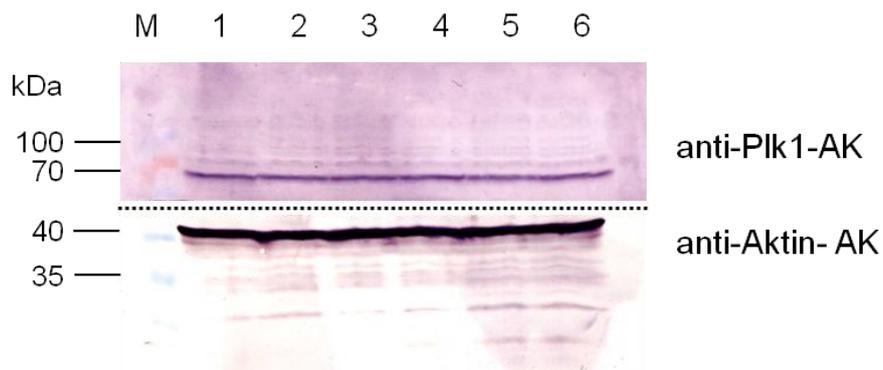
#### 5.4.2.6 Internalisierung des Aptamer-Streptavidin-PLK1-siRNA-Konjugats in U937-Zellen

Es konnte einerseits gezeigt werden, dass das AIR-3A-Aptamer als Streptavidin-Konjugat an IL-6R-tragenden Zellen gebunden hat und internalisiert wurde (5.4.2.2). Andererseits wurde nachgewiesen, dass die PLK1-siRNA selbst als Streptavidin-Konjugat PLK1 in U937-Zellen herunterreguliert (Abbildung 72). Im nächsten Schritt sollte die Aufnahme der PLK1-siRNA als Streptavidin-Konjugat über eine Zell-spezifische und Aptamer-vermittelte Internalisierung erfolgen. Dazu wurden U937-Zellen für zwei Tage mit verschiedenen Konjugaten inkubiert und PLK1 in einer Western-Blot-Analyse immunologisch nachgewiesen. Die verwendeten Konjugate waren AIR-3A-Streptavidin-PLK1-siRNA, das sich statistisch aus je zwei AIR-3A-Aptameren und PLK1-siRNA-Molekülen zusammensetzte (Abbildung 73b). Analog dazu wurde das AIR-3A-G17U-Streptavidin-PLK1-siRNA-Konjugat verwendet, das die nicht-bindende AIR-3A-Variante AIR-3A-G17U enthält, in der an der 17. Position ein Guaninrest gegen eine Uracilbase ausgetauscht wurde. Als weitere Kontrollen dienten Konjugate, die sich nur aus PLK1-siRNA (Abbildung 73a), AIR-3A-Aptamer oder der Variante AIR-3A-G17U (Abbildung 73c) zusammensetzten.



**Abbildung 73: Streptavidin-Konjugate bestehend aus dem Aptamer AIR-3A, dessen Variante AIR-3A-G17U und/oder PLK1-siRNA.** PLK1-siRNA über biotinylierten Linker an Streptavidin konjugiert (a), biotinyliertes PLK1-siRNA-Konstrukt und biotinyliertes Aptamer im Verhältnis 1:1 über Streptavidin konjugiert (b) und biotinyliertes Aptamer über Streptavidin konjugiert (c).

In Abbildung 74 ist die resultierende Western-Blot-Analyse zu sehen, in der die Regulation des PLK1-Proteins anhand der mit Antikörpern detektierten Bandenintensitäten zu bestimmen war. Die Voraussetzung für den Vergleich aller Ansätze im Western-Blot untereinander war, dass der dieselbe Probenmenge in jedem Ansatz vorlag. Dies wurde über den immunologischen Nachweis des Haushaltsgens Aktin bewerkstelligt (Abbildung 74, unten) und beim Vergleich der resultierenden Banden des 42 kDa großen Proteins, wiesen alle Banden dieselbe Intensität auf.



**Abbildung 74: Einfluss des PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugats auf U937-Zellen ohne Transfektion.** Jeweils  $10^6$  U937-Zellen wurden mit je 500 pmol Streptavidin-Konjugaten versetzt und für zwei Tage inkubiert. Die geernteten Zellen wurden über SDS-Loading-Dye aufgeschlossen und die Proteine über eine 12%ige SDS-PAGE getrennt. Der immunologische Nachweis von PLK1 (anti-PLK1-AK oben) erfolgte über einen Imuno-Blot. Dabei wurde der Blot horizontal durchtrennt (gestrichelter Linie), um auf dem unteren Teil die Ladekontrolle Aktin (anti-Aktin-AK, unten) nachzuweisen. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion der konjugierten alkalischen Phosphatase am sek. AK. Aufgetragen wurden der *Prestained Protein Ladder* (M), unbehandelte Zellen (1) und Zellen die mit den Konjugaten bestehend aus PLK1-siRNA-Streptavidin (2), PLK1-siRNA-AIR-3A-Streptavidin (3), AIR-3A-Streptavidin (4), PLK1-siRNA-AIR-3A-G17U-Streptavidin (5) oder AIR-3A-G17U-Streptavidin (6) inkubiert wurden.

Im oberen Teil des Immunprints wurde PLK1 immunologisch nachgewiesen (Abbildung 74, oben). In Spur 1 wurden U937-Zellen aufgetragen, die nicht behandelt wurden und es war eine deutliche Bande detektierbar, die dem 68 kDa großen PLK1-Protein entspricht. Bei vergleichender Betrachtung der detektierten Banden aller Ansätze war zu sehen, dass diese sich nicht bezüglich der Intensität oder Größe von den unbehandelten Zellen unterschieden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Inkubation der verschiedenen Konjugate unter diesen gewählten Bedingungen keinen regulatorischen Einfluss auf die Expression des Proteins PLK1 hatte.

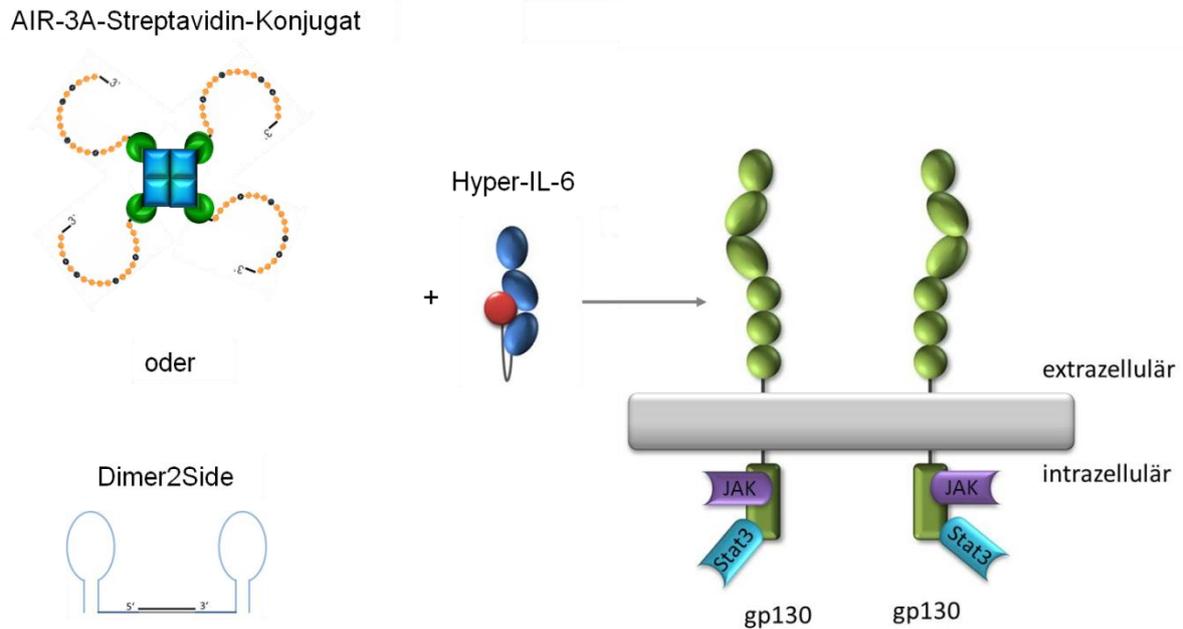
#### 5.4.2.7 Blockade des IL-6-Signalings durch Aptamer-Streptavidin-Konjugate

Es sollte untersucht werden, ob die Bindung des AIR-3A-Streptavidin-Konjugats an Hyper-IL-6 Einfluss auf das IL-6-Signaling hat. Die Bindung des Konjugats und Hyper-IL-6 könnte Interaktion zum Signal-überträger gp130 inhibieren (Abbildung 73a). Andererseits könnte es durch Bindung mehrerer Hyper-IL-6-Moleküle pro Konjugat zu einer negativem Rückkopplung kommen, die in der Verringerung der biologischen Antwort zum Tragen kommen könnte [99]. Um das herauszufinden wurde Hyper-IL-6 von den Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen entfernt und diese über das Zytokin IL-3 stimuliert. Anschließend wurde Hyper-IL-6 mit dem AIR-3A-Streptavidin-Konjugat (im Verhältnis 1:10) inkubiert und danach zu den Zellen gegeben. Der Einfluss auf das IL-6-Signaling wurde über die Phosphorylierung von STAT3 zu pSTAT3 beobachtet, welches im natürlichen IL-6-Signaling als eines der ersten Proteine phosphoryliert wird und immunologisch nachgewiesen wurde (Abbildung 73b).

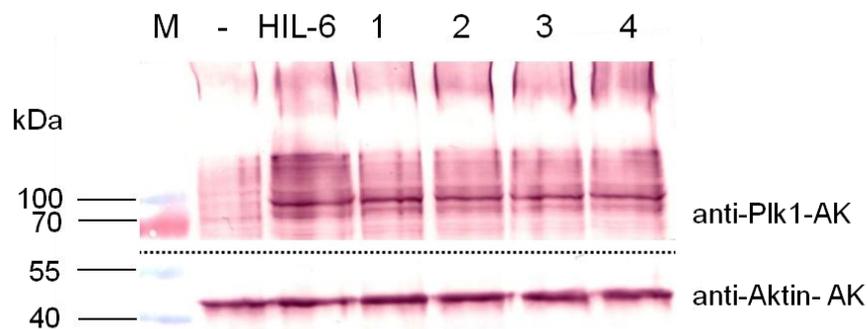
Gleichzeitig wurde derselbe Versuch mit dem DNA-Aptamer Dimer2Side sowie dessen nicht-bindenden Variante Dimer2Side 2xG6T durchgeführt. Da Dimer2Side aus zwei Aptameren besteht und nachweislich an Baf\_gp130\_IL-6R-Zellen gebunden hat, könnte auch dieses Aptamer inaktivierend auf das IL-6-Signaling wirken (Abbildung 75a und b).

Das pSTAT3 weist eine Größe von 90 kDa auf und war in Baf\_gp130-hIL-6R-Zellen, die nur mit dem Zytokin IL-3 stimuliert wurden, nicht zu sehen, da IL-3 die Zellen über STAT5 stimuliert (Abbildung 73). Im Vergleich dazu sind die Zellen zu betrachten, die mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden. Dort ist deutlich eine Bande zu sehen, mit der entsprechenden Größe des pSTAT3. In den folgenden Spuren wurden die AIR-3A-Aptamer-Konjugate und dessen Variante AIR-3A-G17U aufgetragen und auch hier ist jeweils eine pSTAT3-Bande zu sehen. Im Vergleich zu der Bande, die nach Hyper-IL-6-Stimulation zu sehen ist, sind alle drei Banden bezüglich Intensität und Größe gleich. Das Fehlen eines Unterschieds der Banden zueinander, zeigte, dass die Bindung des AIR-3A-Streptavidin-Konjugats keinen Einfluss auf das IL-6-Signaling hat.

a



b

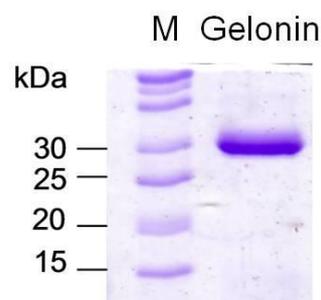


**Abbildung 75: Einfluss des AIR-3A-Streptavidin-Konjugats und des Dimer2Side-Aptamers auf das IL-6-Signaling nach Hyper-IL-6-Bindung.** Zum einen wurde das AIR-3A-Streptavidin-Konjugat mit Hyper-IL-6 inkubiert und anschließend zu IL-3-stimulierten Baf\_gp130-Zellen gegeben und zum anderen wurde das Dimer2Side-Konstrukt mit Hyper-IL-6 inkubiert und zu den Zellen gegeben (a). Der Einfluss der Konstrukte auf das IL-6-Signaling wurde im Anschluss über einen immunologischen Nachweis von pSTAT3 durchgeführt (b). Dazu wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Baf\_gp130-Zellen zur Entfernung von IL-6 gewaschen und in FKS-freiem Medium aufgenommen und mit IL-3 stimuliert. Je 500 pmol der Aptamere wurden für zwei Stunden zu den Zellen gegeben und nach Zugabe von FKS-haltigem Medium über Nacht inkubiert. Die geernteten Zellen wurden über SDS-Loading-Dye aufgeschlossen und die Proteine über eine 9% SDS-PAGE getrennt. Der immunologische Nachweis von pSTAT3 (anti-pSTAT3-AK, oben) erfolgte über einen Western Blot. Dabei wurde der Blot horizontal durchtrennt (gestrichelter Linie), um auf dem unteren Teil die Ladekontrolle Akin (anti-Aktin-AK, unten) nachzuweisen. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion der konjugierten alkalischen Phosphatase am sek. AK. Hyper-IL-6 wurde im 10-fachen molaren Überschuss mit dem AIR-3A-Streptavidin-Konjugat (1), AIR-3A-G17U-Streptavidin-Konjugat, Dimer2Side (3) oder Dimer2Side 2xG6T (4) inkubiert und anschließend zu IL-3-stimulierten Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden IL-3-stimulierte allein (-) und IL-3-stimulierte Zellen zu denen Hyper-IL-6 (HIL-6) gegeben wurde aufgetragen sowie der *Prestained Protein Ladder* (M).

### 5.4.3 KOPPLUNG DES HIL-6R-BINDENDEN APTAMERS MIT GELONIN

Zur zellspezifischen Übertagung von Substanzen über Aptamere können diese kovalent mit toxischen Proteinen verknüpft werden, unter der Voraussetzung, dass es sich nicht um ein zellgängiges Toxin handelt [100]. Das 30 kDa große Protein Gelonin wird zu den Ribosom-inaktivierenden Proteinen gezählt, da es RNA in Ribosomen depuriniert und inhibierend auf die Proteinbiosynthese wirkt. Durch das Fehlen der Lekin-Untereinheit ist Gelonin für intakte Zellen nicht toxisch, da Gelonin allein nicht die Zellmembran passieren kann. Aus diesem Grunde eignet sich Gelonin für eine Kopplung an AIR-3A. In vorangegangenen Arbeiten wurde Gelonin bereits als Fusions-Protein produziert, um beispielsweise gezielt in aggressiven Lymphom-Zellen (*Diffuse large B-cell lymphoma*) eingebracht zu werden [101], als Immunotoxin, indem es an einen Thy<sub>1.1</sub>-Antikörper, der T-Lymphozyten bindet gekoppelt wurde [102] oder als Aptamer:Toxin-Konjugat, um speziell in Prostata-krebszellen zu agieren [47].

Das verwendete Gelonin wurde käuflich erworben und zur Kontrolle der Reinheit elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 76). Nach der Färbung war eine ca. 30 kDa große Bande zu detektieren gewesen, die der Größe des Gelonins entspricht. Außer dieser Bande waren keine weiteren Verunreinigungen durch weitere Proteine auszumachen.

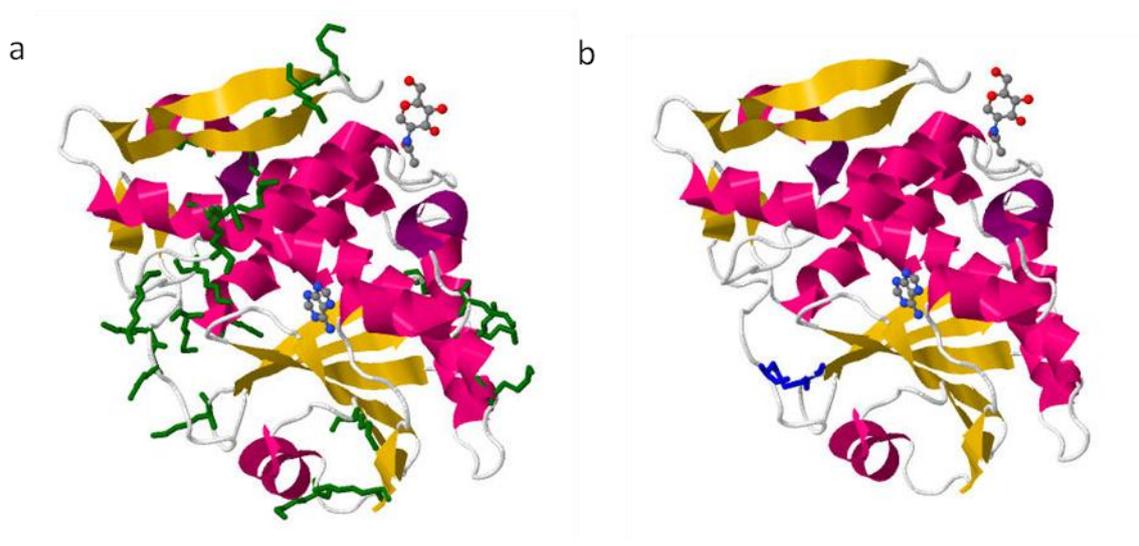


**Abbildung 76: Kontrollgel des Ribosomen-inaktivierenden Proteins Gelonin.** Zur Kontrolle wurde Gelonin elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt und die Größe mit einem *Unstained Protein Ladder* (M) verglichen.

Zur kovalenten Verbindung von Proteinen und Nucleinsäuren können Crosslinker eingesetzt werden. Crosslinker bestehen aus hoch reaktiven Verbindungen, deren funktionelle Gruppen gerichtete Reaktionen zwischen verschiedenen Substanzen ermöglichen.

Zu diesem Zweck musste das Aptamer AIR-3A funktionalisiert vorliegen und wurde am 5'-Ende über einen (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-Linker verlängert und mit einer Aminogruppe terminiert

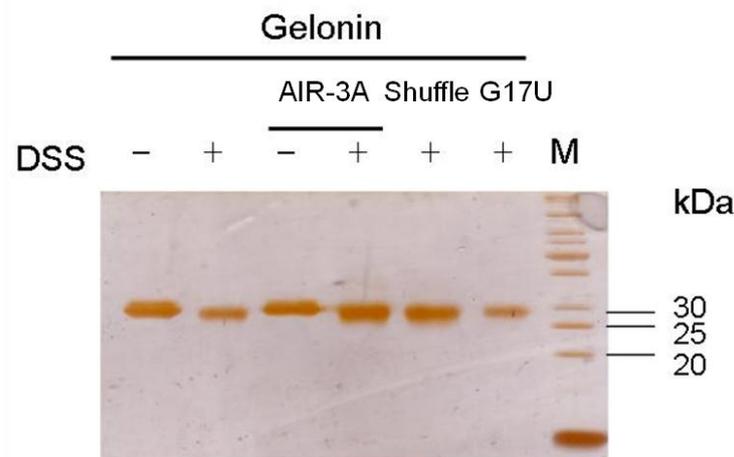
käuflich erworben: (NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> -GGG GAG GCU GUG GUG AGG G-3'). Die Wahl des Crosslinkers wurde darüber bestimmt, welche funktionellen Gruppen seitens des Gelonins angegriffen werden sollten. In Abbildung 77 ist die Kristallstruktur des Gelonins gezeigt und die funktionellen Gruppen, die in Frage kamen, sind hervorgehoben. Zum einen bestand die Möglichkeit, das Aptamer an die Lysinreste reagieren zu lassen (Abbildung 77a, grün). Gelonin weist schätzungsweise 18 Lysinreste auf, die von außen zugänglich wären. Zur Umsetzung dieser Reaktion wurde der Crosslinker DSS verwendet. Dabei handelt es sich um einen homobifunktionalen Crosslinker, der an beiden Enden Amin-reaktive *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) besitzt, die über einen C<sub>8</sub>-Linker verbundenen sind (Tabelle 20). Die Verwendung dieses Crosslinkers ermöglichte die Verbindung zwischen Aptamer und Protein an potenziell 18 Stellen des Proteins. Nachteilig an diesem Crosslinker sind die ungerichtete Reaktion und die Reaktivität der Komponenten untereinander. Somit könnten sich ebenfalls Aptamer-Dimere und Protein-Protein-Verbindungen bilden.



**Abbildung 77:** Kristallstruktur des Ribosomen-inaktivierenden Proteins Gelonin (PDB 3KUO, [103]). Die Struktur des Gelonins wird in  $\alpha$ -Helices (rosa) und  $\beta$ -Faltblätter (gelb), die über nicht-strukturierte Loops verbunden werden (grau), dargestellt. Es wurden Lysinreste (a, grün) und die Disulfidbindung (b, blau) hervorgehoben.

Es wurde der Crosslink mit DSS durchgeführt. Dazu wurde Gelonin mit dem aminomodifizierten AIR-3A-Aptamer versetzt. Zur Kontrolle wurde parallel das Gelonin mit DSS versetzt, um zu sehen, inwiefern das Gelonin Aggregate bildet. Außerdem wurden das Gelonin und das aminomodifizierte AIR-3A-Aptamer ohne DSS inkubiert, um eine Reaktivität ohne Crosslinker auszuschließen. Zusätzlich wurden zum Crosslinking nicht-bindende AIR-3A-Varianten verwendet. In der Kontrolle AIR-3A-G17U führte ein Basenaustausch an 17. Position zu einem Bindungsverlust an hIL-6R

und AIR-3A-Shuffle wies dieselbe Basen-Zusammensetzung wie AIR-3A jedoch in abweichender Reihenfolge auf. Diese zwei Varianten trugen ebenfalls am 5'-Ende eine Aminogruppe und wurden mit Gelonin über DSS verknüpft. Nach der Reaktion wurden die Produkte in einer 9%igen SDS-PAGE getrennt über eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 78).



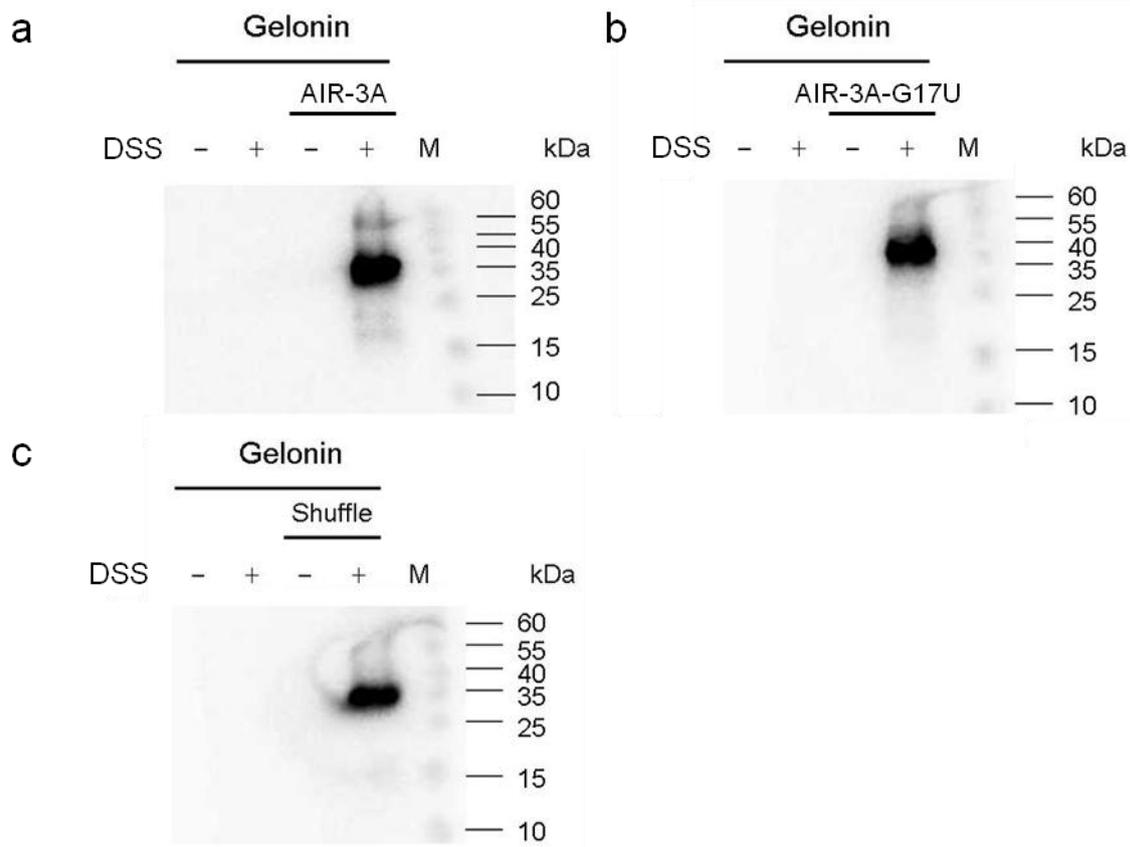
**Abbildung 78: Analyse des DSS-Crosslinking des aminomodifizierten RNA-Aptamers AIR-3A mit dem Toxin Gelonin.** Gelonin wurde mit dem aminomodifizierten AIR-3A-Aptamer, den nicht bindenden Varianten AIR-3A-G17U und AIR-3A-Shuffle unter Verwendung von DSS mit Gelonin gecrosslinked. Auf einem 9% SDS-Polyacrylamidgel wurden zusätzlich Gelonin allein, Gelonin allein mit DSS, Gelonin mit AIR-3A in Abwesenheit von DSS und der *Unstained Protein Ladder* (M) aufgetragen und einer Silberfärbung unterzogen.

Gelonin ist ein 30 kDa großes Protein und das RNA-Aptamer AIR-3A entspricht ca. 6 kDa. Bei erfolgter Reaktion zwischen Aptamer und Protein sollten weitere Banden im Gel zu sehen sein. Die Reaktion des aminomodifizierten Aptamers AIR-3A als auch die Reaktion der AIR-3A-Varianten führten nicht zu einer zusätzlichen sichtbaren Bande im silbergefärbten Gel, die größer als 30 kDa war (Abbildung 78). Zusätzlich ist zu sehen, dass die Inkubation des Gelonins allein mit dem Crosslinker ebenfalls zu keiner Verbindung der Proteine untereinander führte.

Aus der erfolgten SDS-PAGE zur Analyse der Reaktion zwischen Aptamer und Protein war kein Crosslink der Komponenten erkennbar.

Bekannterweise sind die Ausbeuten für Kopplungsreaktionen mit Crosslinkern sehr gering und der Anteil der erfolgten Reaktion liegt unterhalb der über Silberfärbung möglichen Nachweisgrenze. Aus diesem Grunde wurden die Proteine nach dem DSS-Crosslinking erneut über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden hergestellt, die

komplementär zum AIR-3A-Aptamer als auch deren Varianten waren, um gebundene RNA am Gelonin nachzuweisen. Dazu wurde die radioaktiv markierte Sonde über Nacht mit dem Blot inkubiert und der hybridisierte Anteil der Sonde über Autoradiographie nachgewiesen. Zur Bestimmung der Proteingröße, wurde der *Prestained Protein Ladder* manuell aufgetragen, der anschließend zur Detektion mit radioaktiv markierter DNA sichtbar gemacht wurde.



**Abbildung 79: Analyse des DSS-Crosslinking des Aptamers-AIR-3A sowie dessen nicht bindenden Varianten AIR-3A-G17U und Shuffle an Gelonin.** Das Crosslinking der jeweiligen RNAs mit Gelonin wurde mit dem Crosslinker DSS durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Crosslink in Abwesenheit des Crosslinkers durchgeführt als auch der Crosslinker allein mit Gelonin inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze als auch das Gelonin selbst in einem 9% SDS-PAGE getrennt. Zur Größenabschätzung diente der *Prestained Protein Ladder* (M). Anschließend wurden die Proteine in einem Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der kovalent gebundenen RNA wurde unter Verwendung von radioaktiv markierten, komplementären DNA-Sonden durchgeführt. Es wurden das hIL-6R-bindende-Aptamer AIR-3A (a) als auch die nicht bindenden Varianten AIR-3A-G17U (b) und AIR-3A-Shuffle (c) dem Crosslinking mit Gelonin unterzogen. Um den Proteinmarker für die autoradiographische Detektion sichtbar zu machen, wurde dieser manuell mit radioaktiver DNA markiert (4.2.3).

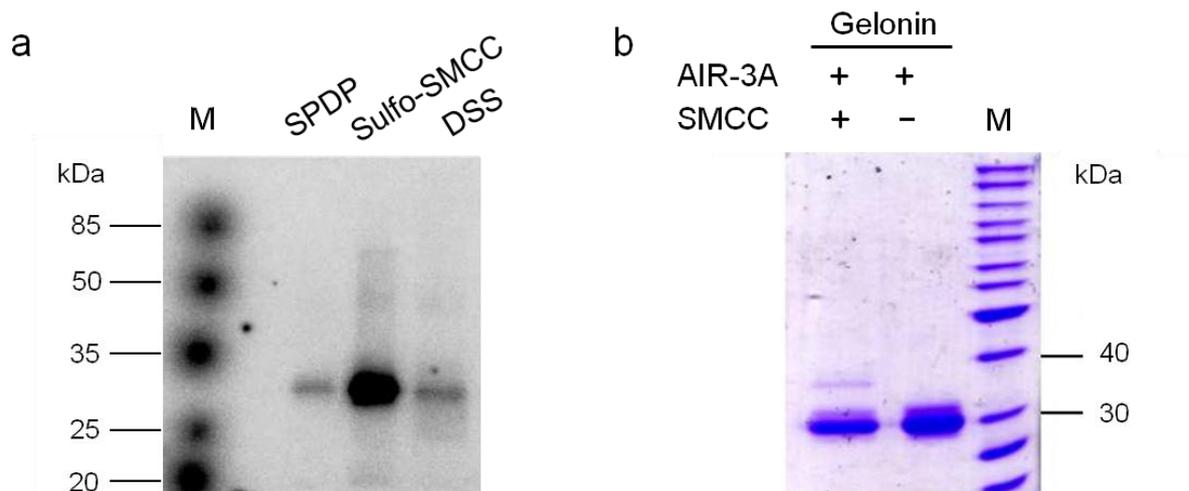
In Abbildung 79 ist das Ergebnis der Analyse des Crosslinkings von Aptamer und Gelonin zu sehen. Für das AIR-3A-Aptamer, das mittels DSS mit Gelonin verknüpft wurde, ist eine deutliche Bande mit einer Größe von ungefähr 35 kDa erkennbar (Abbildung 79a). 35 kDa entsprechen der erwarteten Größe für die Reaktion eines Aptamer-Moleküls an Gelonin. Dies spricht dafür, dass der Crosslink funktioniert hat.

Die Inkubation des AIR-3A-Aptamers mit Gelonin ohne Crosslinker führte nicht zu einer Bindung der AIR-3A-Sonde. Es handelte sich folglich nicht um eine unspezifische Assoziation zwischen Aptamer und Protein, sondern um einen erfolgten Crosslink. Zudem hat die Sonde ebenfalls nicht unspezifisch an Gelonin selbst gebunden. Die nicht-bindenden Varianten AID-3A-G17U und AIR-3A-Shuffle wurden ebenfalls mit Gelonin verknüpft und konnten auch mit spezifischen Sonden nachgewiesen werden (Abbildung 79b und c). Das Crosslinking der AIR-3A-Varianten mit Gelonin hatte folglich ebenfalls funktioniert.

Da der verknüpfte Anteil des Aptamers an Gelonin sehr gering war und eine Reinigung über Affinitätschromatographie fehlschlug (nicht gezeigt), wurden andere Crosslinker verwendet. Die Verwendung von heterobifunktionalen Crosslinkern würde zu einer gerichteten Reaktion zwischen Aptamer und Protein führen und Nebenreaktionen ausschließen. Seitens des Proteins Gelonin sollte eine Disulfidbrücke aufgebrochen werden, woran anschließend das Aptamer kovalent gebunden wird (Abbildung 77b). Dazu wurde zum einen der Crosslinker SPDP verwendet, der auf der einen Seite einen NHS-Ester besitzt und wiederum der über einen C<sub>3</sub>-Linker mit einer Pyridyldisulfidgruppe verbunden ist (Tabelle 20). Vorteil dieses Crosslinkers ist die reversible Disulfidbindung. Andererseits wurde der Crosslinker Sulfo-SMCC verwendet, der über eine Maleinimidgruppe zu einer stabilen Thioesterbindung führt. Die Maleinimidgruppe ist wiederum an einen NHS-Ester gekoppelt.

Die Crosslink-Reaktion wurde von Herrn Sven Kruspe durchgeführt und gliederte sich in drei Schritte. Im ersten Schritt erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücke im Gelonin über DTT. Nach Entfernung des Reduktionsmittels reagierte der Crosslinker über einen freien Cysteinrest mit dem Gelonin. Der am Gelonin befindliche Crosslinker reagierte im letzten Schritt über den NHS-Ester mit der Aminogruppe des Aptamers.

Der Erfolg des Crosslinking wurde über radioaktive Sonden und über eine Coomassiefärbung nach erfolgter SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionsansätze des Crosslinking von Aptamer und Protein mittels SPDP, Sulfo-SMCC und DSS in einem 10%igen Gel elektrophoretisch getrennt und über ein Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte der Nachweis des AIR-3A-Aptamers am Protein über eine radioaktive Sonde.



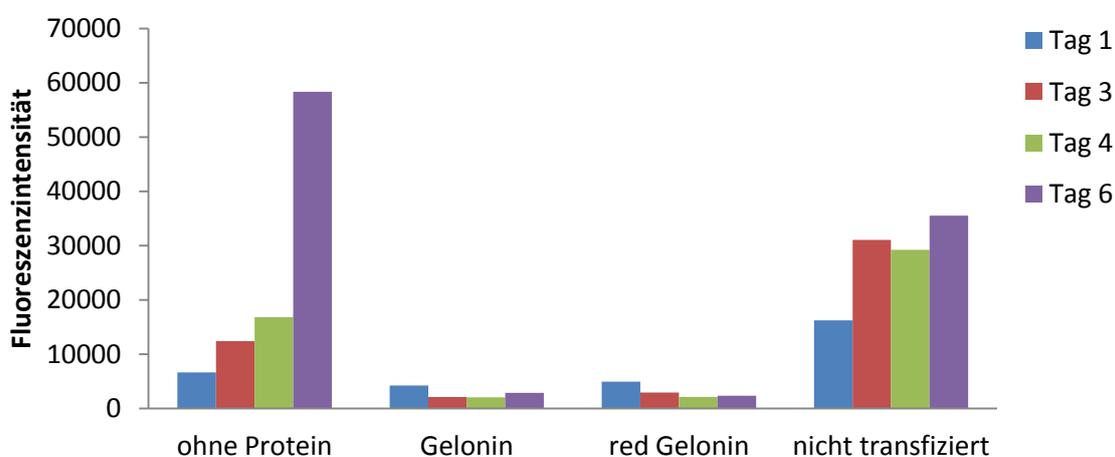
**Abbildung 80: Analyse der Verknüpfung des AIR-3A-Aptamers mit Gelonin mittels verschiedener Crosslinker.**

Die Verknüpfung von Gelonin mit AIR-3A erfolgte mit den Crosslinkern DSS, Sulfo-SMCC und SPDP. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze in einem 10%igen SDS-PAGE getrennt. Zum einen wurden die Proteine über ein Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und gecrosslinkte AIR-3A-RNA über eine radioaktiv markierte Sonde gebunden und über Autoradiographie detektiert. Zur Größenabschätzung diente der *Prestined Protein Ladder* (M), der manuell radioaktiv markiert wurde (a). Zum anderen wurde der Reaktionsansatz mit dem Crosslinker Sulfo-SMCC (SMCC) nach einer SDS-PAGE in einem 10% Gel über Coomassie nachgewiesen und eine *Unstained Protein Ladder* (M) diente zum Größenvergleich (b).

Nach Detektion der Sonde über Autoradiographie konnten für alle drei Crosslinker das AIR-3A-Aptamer am Protein nachgewiesen werden (Abbildung 80a). Da für alle Reaktionsansätze gleiche Mengen an Protein und RNA eingesetzt wurden, ließ der Vergleich der Intensitäten der Banden Rückschlüsse auf den Anteil des erfolgten Crosslinkings zu. Demnach ergab das Crosslinking mit Sulfo-SMCC die intensivste Bande. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz, der mit Sulfo-SMCC durchgeführt wurde, gelelektrophoretisch analysiert und einer Coomassiefärbung unterzogen. Im resultierenden Coomassie-Gel (Abbildung 80b) ist deutlich eine Bande mit einer Größe von 30 kDa zu sehen. Dies entspricht dem Gelonin ohne Aptamer. Oberhalb dieser Bande ist eine weitere Bande zu sehen, die in etwa der Größe des Gelonins mit einem AIR-3A-Aptamer-Molekül entsprechen würde. Die Quantifizierung mittels QuantityOne ergab, dass 16% des Gelonins mit dem AIR-3A-Aptamer reagiert hat. Die anschließende Reinigung des Crosslinking-Produkts wurde über Affinitätschromatographie (Kationen- und Anionen-Austauschchromatographie) angegangen. Es war leider nicht möglich das Protein Gelonin vom Gelonin-Aptamer-Komplex zu trennen (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 5.4.3.1 Toxizitätstest

Im Folgenden wurde die Toxizität des Gelonins für eukaryotische Zellen untersucht. Dazu wurden Zellen mit Gelonin transfiziert und die Proliferation der Zellen nach zwei Tagen bestimmt. Dazu diente eine Substanz (AlaramBlue), die durch die Reduktionprozesse der Zelle (wie Zellatmung) zu einer fluoreszierenden Substanz oxidiert wird. Wirkt Gelonin toxisch auf die Zellen, dann verringert sich die Fähigkeit zur Proliferation, AlarmaBlue wird kaum oxidiert und weniger Fluoreszenzfarbstoff wird gebildet. Zum Vergleich dienten Zellen, die keiner Transfektion unterzogen wurden und welche, die ohne Protein transfiziert wurden.



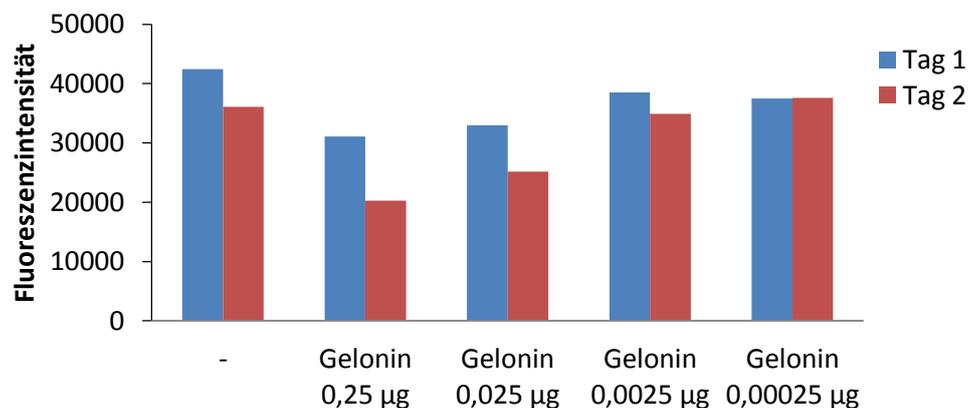
**Abbildung 81: Analyse der Toxizität von Gelonin nach Transfektion von HeLa-Zellen.** Zur Transfektion wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ L Medium mit 0,25  $\mu$ g Gelonin oder durch DTT reduziertes Gelonin (red Gelonin) transfiziert und insgesamt 6 Tage inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelten Zellen und Zellen (nicht transfiziert), die der Transfektion unterzogen wurden, jedoch ohne Zugabe von Protein (ohne Protein). Es wurden vier Ansätze parallel angesetzt und nach 1, 3, 4 oder 6 Tagen die Fähigkeit zur Proliferation untersucht. Dazu wurde der Indikator AlarmaBlue zu den Zellen gegeben und nach 4 h die Fluoreszenzintensität des oxidierten Indikators gemessen.

In Abbildung 81 sind die Ergebnisse der Transfektion von HeLa-Zellen mit Gelonin zu sehen. Je weniger die Fluoreszenzintensität, desto weniger sind die Zellen in der Lage, zu proliferieren. Die Zellen die nicht transfiziert wurden, zeigten über die sechs Tage eine gleichmäßige Fluoreszenzintensität und proliferierten im gleichen Maße. Zellen, die hingegen ohne Zugabe von Gelonin transfiziert wurden, zeigten nach einem Tag eine verringerte Proliferation, die jedoch innerhalb der sechs Tage anstieg. Die Zellen, die mit Gelonin oder reduziertem Gelonin transfiziert wurden, proliferierten bereits nach einem Tag kaum. In den darauffolgenden Tagen sank die Proliferationsfähigkeit weiter ab.

Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Gelonin eine toxische Wirkung auf HeLa-Zellen hat, wenn es über eine Transfektion in das Innere der Zelle gelangt. Es

wurden ebenso U937- und HepG2-Zellen mit Gelonin transfiziert, jedoch starben die U937-Zellen durch die Transfektion selbst und die HepG2-Zellen waren nicht in der Lage mit dem verwendeten Transfektionsreagenz Proteine aufzunehmen (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem war das Transfektionsreagenz für die Baf-Zellen nicht geeignet. Auf Grund dessen wurden die weitem Toxizitätstest mit HeLa-Zellen durchgeführt.

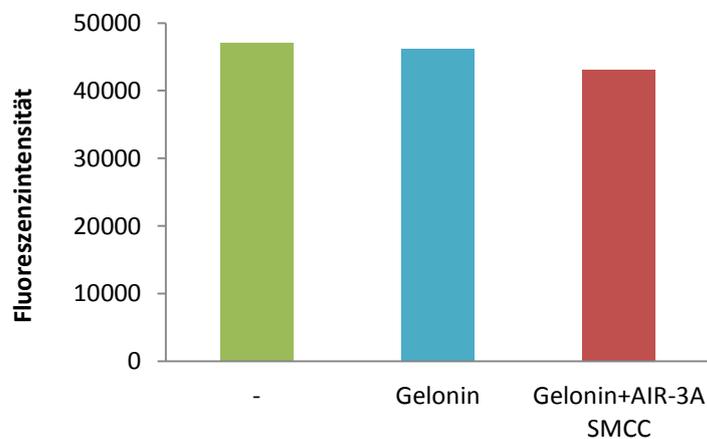
Nachdem gezeigt wurde, dass Gelonin toxisch auf HeLa-Zellen wirkt, wurden anschließend HeLa-Zellen mit verschiedenen Gelonin-Mengen (0,00025 - 0,25 µg/100 µL Medium) transfiziert. Dies diente dem Zweck, herauszufinden, wie viel Gelonin notwendig ist, um bei  $2 \times 10^4$  Zellen innerhalb von einem oder zwei Tagen einen Effekt zu sehen. Die Zell-Proliferation wurde wieder über die Detektion des oxidierten Indikators AlarmaBlue durchgeführt (Abbildung 82).



**Abbildung 82: Bestimmung die für HeLa-Zellen toxische Gelonin-Menge.**  $2 \times 10^4$  Zellen wurden in 100 µL Medium mit verschiedenen Gelonin-Mengen transfiziert und nach 1 und 2 Tagen die Proliferationsfähigkeit über den Indikator AlarmaBlue untersucht. Dazu wurde AlarmaBlue zu den Zellen gegeben und nach 4 h die Fluoreszenzintensität des oxidierten Indikators gemessen. Zum Vergleich wurden parallel Zellen vermessen, die nicht behandelt wurden (-).

Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten standen in direkter Relation zur Zell-Proliferation. Je weniger Fluoreszenz detektiert wurde, desto toxischer war die Wirkung des Gelonins auf die Zellen. Beim Vergleich der verschiedenen Gelonin-Mengen ist zu sehen, dass die Proliferation der Zellen mit zunehmender Gelonin-Menge verringert wird. 0,25 µg/100 µL Gelonin und 0,025 µg/100 µL Gelonin wirkten sich deutlich negativ auf die Proliferation der Zellen aus, wobei die Inkubation nach zwei Tagen einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen zeigte. Geringere Mengen an Gelonin (2,5 ng/100 µL und 0,25 ng/100 µL) beeinflussten die Zellen innerhalb zweier Tage nicht in ihrer Proliferation.

Schließlich wurden Gelonin und der Crosslink von Gelonin und AIR-3A mittels Sulfo-SMCC mit Zellen inkubiert, die den humanen IL-6-Rezeptor trugen. Der Crosslink-Ansatz wurde zu diesem Zweck nicht gereinigt, da davon ausgegangen wurde, dass das Gelonin allein nicht in die Zellen gelangen kann. Das Gemisch setzte sich aus 16% Gelonin-AIR-3A und 84% Gelonin zusammen. Aus diesem Grund wurden 1,75 µg des Crosslink-Gemisches verwendet, in dem theoretisch 0,25 µg Gelonin-AIR-3A vorliegen sollten. Parallel dazu wurden die Zellen mit Gelonin inkubiert. Die Inkubation mit den Zellen erfolgte für zwei Stunden in FKS-freiem Medium. Anschließend daran wurde FKS zu den Zellen gegeben und für weitere zwei Tage kultiviert und die Proliferation mittels des Indikators AlarmaBlue bestimmt. In Abbildung 83 ist beispielhaft das Ergebnis mit HeLa-Zellen gezeigt. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der unbehandelten Zellen mit denen, die mit Gelonin oder Gelonin-AIR-3A inkubiert wurden, zeigt keine signifikanten Unterschiede. Zum Vergleich wurde zusätzlich das zellgängige Toxin Cycloheximid verwendet und führte zum Verlust der Proliferationsfähigkeit der Zellen (Abbildung 83, orangener Balken). Es konnte gezeigt werden, dass Gelonin selbst keinen Einfluss auf intakte HeLa-Zellen hat und außerdem dass Gelonin-AIR-3A ebenfalls nicht zum Tod der Zellen führte.



**Abbildung 83: Analyse der toxischen Wirkung des Gelonins und des Gelonin-AIR-3A-Crosslinking auf HeLa-Zellen.**  $2 \times 10^4$  Zellen wurden mit Gelonin (0,25 µg/100 µL) und dem Gelonin-AIR-3A-Crosslink inkubiert. Der Gelonin-AIR-3A-Crosslink wurde nicht gereinigt und machte neben Gelonin allein 16% des Gemisches aus. Ausgehend davon wurden 1,75 µg des Crosslinking-Ansatzes verwendet. Die Inkubation fand für zwei Stunden in FKS-freiem Medium statt. Anschließend wurde FKS zu den Zellen gegeben und nach zwei Tagen die Proliferationsfähigkeit über den Indikator AlarmaBlue untersucht. Dazu wurde AlarmaBlue zu den Zellen gegeben und nach vier Stunden die Fluoreszenzintensität des oxidierten Indikators gemessen. Zum Vergleich wurden parallel Zellen vermessen, die nicht behandelt wurden (-) und Zellen, die mit dem zellgängigen Toxin Cycloheximid versetzt wurden.

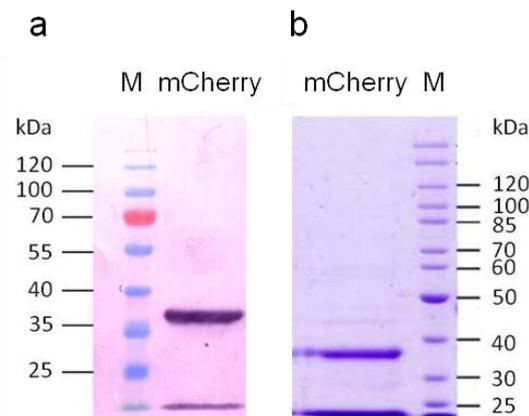
Dieser Versuch wurde ebenfalls mit HeLa-, U937- und Baf\_gp130 und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen durchgeführt, wobei die Ausgangszellzahl für die

Suspensionszellen an die Teilungsrate angepasst wurde ( $1,5 \times 10^4$  Baf und  $2,5 \times 10^4$  U937-Zellen). Leider beeinflusste das Konstrukt Gelonin-AIR-3A bei keiner dieser Zelllinien die Proliferation.

#### 5.4.4 KOPPLUNG DES HIL-6R-BINDENDEN APTAMERS AIR-3A MIT FLUORESZIERENDEN PROTEINEN

Neben der Kopplung des humanen IL-6R-bindenden RNA-Aptamers AIR-3A mit siRNA oder dem Toxin sollten fluoreszierende Proteine an das Aptamer gekoppelt werden.

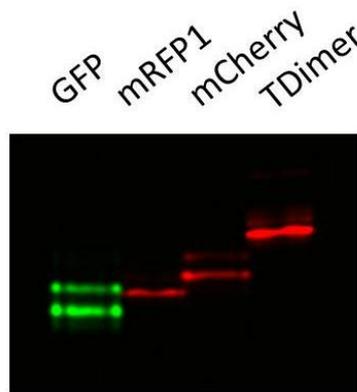
Dazu wurden Derivate des fluoreszierenden Proteins DsRed verwendet. Diese Derivate wurden über Mutationen der codierenden Sequenz generiert und weisen eine Vielfalt von verschiedenen Fluoreszenzspektren auf. In dieser Arbeit wurde mit mCherry, mRFP1 und TDimer gearbeitet, die rekombinant in *E. coli* produziert und über Affinitätschromatographie gereinigt wurden. Anschließend wurde die Reinheit der Proteine in einer 9%igen SDS-PAGE kontrolliert und die Proteine über den His-Tag immunologisch nachgewiesen. In Abbildung 84 ist beispielhaft die Western-Blot-Analyse (a) und die Reinheit (b) des Proteins mCherry dargestellt (Ergebnisse für mRFP1 und TDimer nicht gezeigt).



**Abbildung 84: Western-Blot-Analyse und Coomassie-Färbung des gereinigten mCherry-Proteins.** Rekombinant produziertes und über Affinitätschromatographie gereinigtes Protein mCherry wurde in einer 9% SDS-PAGE getrennt und nach einem Western-Blot-Verfahren über einen His-AK detektiert. Die Detektion erfolgte über eine BCIP/NBT-Farbreaktion der konjugierten alkalischen Phosphatase am sek. AK (a). Die Reinheit des Proteins wurde nach der SDS-PAGE über eine Coomassie-Färbung überprüft (a). M = *Prestained Protein Ladder* (a), *Unstained Protein Ladder* (b).

Im Coomassiegel ist zu sehen, dass das Protein mCherry gereinigt werden konnte (Abbildung 84b). Es ist eine signifikante Bande bei ca. 38 kDa zu sehen, mCherry ist jedoch lediglich 30 kDa groß. Trotz dieser Differenz konnte über einen

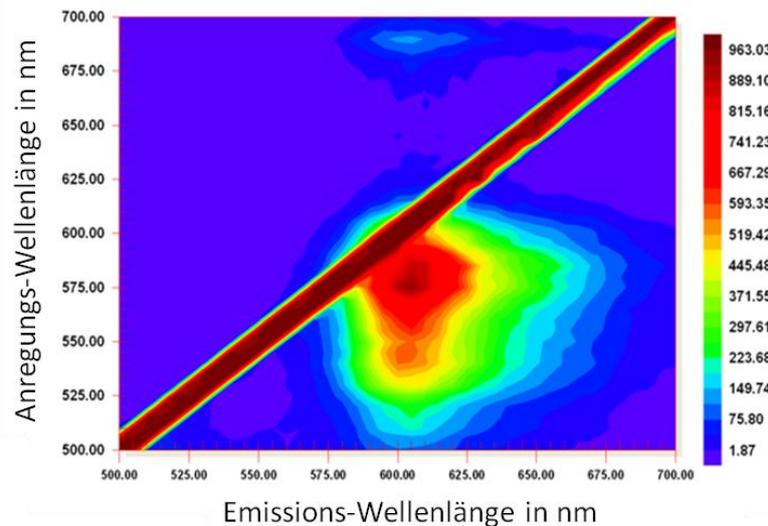
immunologischen Nachweis mit einem His-Antikörper dieselbe Bande detektiert werden (Abbildung 84a). Daraufhin wurden die gereinigten Proteine mCherry, mRFP1 und TDimer zusammen mit GFP (nicht selbst gereinigt) in einer SDS-PAGE analysiert und zur Fluoreszenz angeregt (Abbildung 85).



**Abbildung 85: Kontrollgel der fluoreszierenden Proteine GFP, mRFP1, mCherry und TDimer.** Die rekombinant hergestellten fluoreszierenden Proteine wurden gelelektrophoretisch in einem 9% SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteine wurden vor dem Auftragen in Glycerin aufgenommen und ohne vorheriges Erhitzen aufgetragen. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am *VersaDoc Imaging System* der Firma BioRad unter Verwendung eines Cy5- und Alexa488-Filters.

Auf dem SDS-Gel sind fluoreszierende Banden zu sehen. GFP fluoreszierte im grünen und die DsRed-Derivate im roten Spektralbereich. Da die Proteine nicht erhitzt wurden, sind jeweils mehrere Banden zu sehen. Trotz der Größen-Differenz im Coomassiegel handelte es sich bei den gereinigten Proteinen um die fluoreszierenden Proteine.

Zur Bestimmung der genauen Anregungs- und Emissionswellenlängen, wurden von mRFP1, mCherry und TDimer 3D-Spektren angefertigt. Dabei wurden die Proteine mit verschiedenen Wellenlängen angeregt und die Emission bei verschiedenen Wellenlängen detektiert. Das Resultat war ein 3D-Spektrum in dem die Fluoreszenzintensität anhand einer Farbskala dargestellt wurde (Abbildung 86).



**Abbildung 86: 3D-Spektrum von mCherry.** In einem Fluoreszenz-Spektrometer wurde das Protein mit Licht der Wellenlängen 500 – 700 nm angeregt (Ordinate) und die resultierende Fluoreszenz von 500 – 700 nm detektiert (Abzisse). Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden in einer Farbskala dargestellt.

Aus den 3D-Spektren konnten für alle drei Fluorophore die Anregungs- und Emissionswellenlängen bestimmt und wie folgt zusammengefasst werden.

**Tabelle 35: Anregungs- und Emissionswellenlängen der fluoreszierenden Proteine mRFP1, mCherry und TDimer.**

Fluorophor	Anregung	Emission
mRFP1	550 nm	610 nm
mCherry	575 nm	600 nm
TDimer	550 nm	575 nm

Die fluoreszierenden Proteine mRFP1 und mCherry wurden über DSS mit dem RNA-Aptamer AIR-3A verknüpft. Zum Nachweis der kovalenten Verbindung des Aptamers mit dem Protein wurden die Reaktionsansätze einer 9% SDS-PAGE unterzogen, über ein Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und die RNA mit Hilfe einer radioaktiv markierten DNA Sonde nachgewiesen. Der Erfolg des Crosslinks konnte lediglich radioaktiv nachgewiesen werden und eine Inkubation des Produktes mit Baf<sub>gp130</sub>-hIL-6R Zellen zeigte, dass die fluoreszierenden Proteine nach dem Crosslink nicht an die Zellen zu binden vermochten (durchflusszytometrischen Ergebnisse nicht gezeigt). Der Crosslink der fluoreszierenden Proteine mit den Crosslinkern SPDP oder Sulfo-SMCC war nicht möglich, da die Proteine keine Cysteinreste aufwiesen, die dazu nötig gewesen wären.





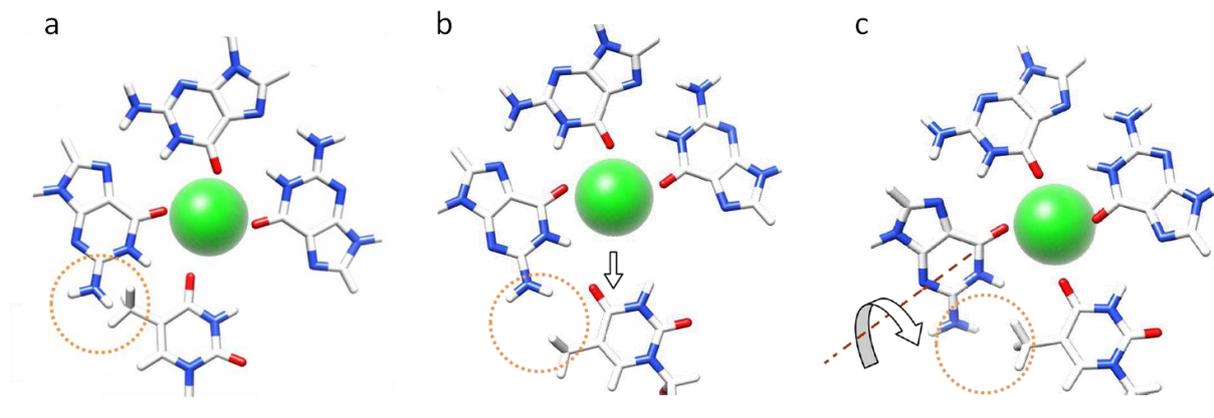
Inwiefern diese Variationen Auswirkungen auf die IL-6R-Bindung haben, wurde über Filterbindungsanalysen und SPR untersucht.

Als erstes wurden Ergebnisse vorheriger Arbeiten reproduziert, um diese zu verifizieren. Dazu wurde im Rahmen einer Filterretentionsstudie die Interaktion zwischen dem IL-6R und dem Aptamer AID-1 als auch der Varianten AID-1-T und AID-1-G6T untersucht (Abbildung 13). Die IL-6R-Bindung konnte für AID-1 und AID-1-T nachgewiesen werden und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten (AID-1  $K_d = 0,19 \mu\text{M}$ , AID-1-T  $K_d = 0,13 \mu\text{M}$ ) entsprachen denen vorhergehender Arbeiten (Tabelle 29, [58]). AID-1-G6T wies eine Guanin-Transversion an Position 6 auf und konnte als nicht-bindende Variante identifiziert. Daraufhin wurden in dieser Arbeit weitere Varianten untersucht, die wie AID-1-G6T eine Thymin-Transversion der mittleren Tetrade aufwiesen (AID-1-G2T, G10T und G14T) und es zeigte sich, dass keine dieser Varianten an IL-6R binden konnte (Abbildung 13).

Welche Auswirkung die Thymin-Transversion der mittleren Tetrade auf die Quadruplex-Struktur hat, wurde anschließend mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht. Quadruplexe absorbieren zirkular-polarisiertes Licht in einer charakteristischen Art und Weise, aus der in einer graphischen Darstellung für einen parallel-angeordneten Quadruplex ein typisches Mini- und Maximum resultiert. Das AID-1-Aptamer wurde bereits CD-spektroskopisch charakterisiert [58, 59]. Vergleichend wurden das AID-1-Aptamer als auch die Varianten G2T, G6T, G10T und G14T einer CD-spektroskopischen Untersuchung unterzogen und mit dem unmodifizierten Aptamer AID-1 verglichen (5.1.1.1). Es zeigte sich, dass eine einzelne Thymin-Transversion der mittleren Tetrade keinen Einfluss auf die Quadruplex-Struktur hatte. Es konnte lediglich anhand der verringerten Elliptizitätsmaxima eine Destabilisierung der Struktur festgestellt werden (Abbildung 16 und 17).

Die Konsequenzen, die der Austausch eines Guaninrestes gegen einen Thyminrest auf die Quadruplex-Struktur hat, kann innerhalb der Tetrade betrachtet werden (Abbildung 88a). Thymin kann im Gegensatz zum Guanin höchstens zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den benachbarten Guaninresten ausbilden. Der Thyminrest könnte sogar über eines der Sauerstoffatome zur Komplexbildung des Kations beitragen. Ein sterisches Problem hingegen stellt die Methylgruppe des Thyminrestes zum benachbarten Guaninrest dar (Abbildung 88a, orangener Kreis). In *in silico* Studien, in

denen die AID-1-Aptamere modelliert und molekulardynamisch simuliert (MD-Simulation) wurden, konnten alternative Positionen des Thyminrestes bestimmt werden [91]. Zur Vermeidung der sterischen Hinderung wurde der Abstand zwischen dem Thyminrest zum Guaninrest vergrößert (Abbildung 88b) oder der benachbarte Guaninrest entging durch eine Torsion der sterischen Hinderung (Abbildung 88c). Van-der-Waalskräfte, die zwischen den Tetraden zur Stabilität der Struktur dienen, könnten zudem die Thymin-Transversion der mittleren Tetrade ausgleichend stabilisiert haben.



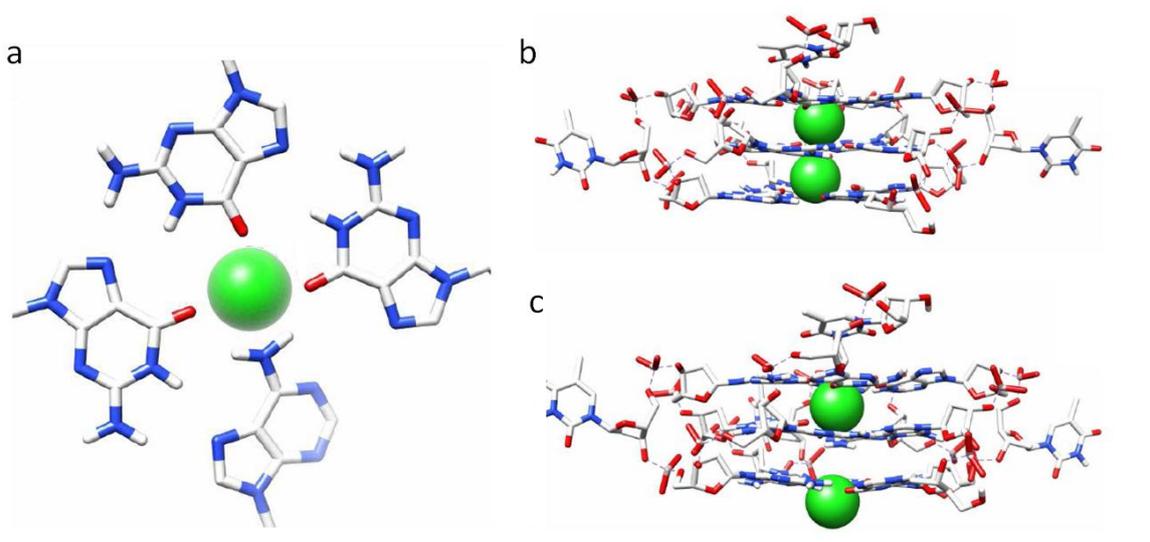
**Abbildung 88: Darstellung der Thymin-Transversion innerhalb einer G-Tetrade [91].** Dargestellt sind die Basen innerhalb einer G-Tetrade, in der ein Guaninrest durch einen Thyminrest ausgetauscht wurde. Liegt der Thyminrest planar zur Ebene der Guaninreste, so kommt es zu sterischen Hinderungen (a, orangefarbener Kreis). MD-Simulationen ergaben eine alternative Positionierung des Thyminrestes in einem größeren Abstand zum Guaninrest (b) oder in Form einer Drehung des Guanins (c). Es handelt sich um eine *Capped-Stick*-Darstellung, in der Kohlenstoff- (weiß), Stickstoff- (blau) und Sauerstoffatome (rot) gezeigt werden und ein monovalentes Kation (grün) über Sauerstoffatome mittig koordiniert wird.

Es sind Quadruplex-ausbildende Strukturen bekannt, in denen in Kombination mit G-Tetraden ebenfalls Thymin-Tetraden (T-Tetraden) vorkommen [105, 106]. Aus diesem Grunde wurde eine AID-1-Variante G1PolyGT hergestellt, in der alle Guaninreste der mittleren Tetrade durch Thyminreste ersetzt wurden (Abbildung 23), so dass zwei G-Tetraden die mittige T-Tetrade umschlossen. CD-spektroskopisch gewonnene Ergebnisse ergaben, dass G1PolyGT keinen Quadruplex-typischen Kurvenverlauf zeigte und somit keine Quadruplex-Struktur ausbildete (Abbildung 24b). Die Ergebnisse, die aus MD-Simulationen erhalten wurden, standen im Widerspruch zu den CD-spektroskopisch gewonnenen [91]. Die Simulationen ergaben für G1PolyGT eine Quadruplex-stabilisierte Struktur, in der sich das untere Kation während der Simulation vom Komplex löste. Diese Diskrepanz der Ergebnisse wird auf Schwächen der MD-Simulation zurückgeführt [91]. Einerseits könnte die MD-Simulationszeit mit 35 sek zu kurz gewesen sein, um die Instabilität des Komplexes darzustellen oder andererseits

könnte G1PolyGT eine andere stabile aber Quadruplex-lose Struktur eingenommen haben. Die weitere AID-1-Variante G1NK3 wies neben der mittleren T-Tetrade jeweils eine Thymin-Transversion der oberen und unteren Tetrade auf (Abbildung 23) und zeigte sowohl CD-spektroskopisch als auch in MD-Simulation keine Anzeichen zur Ausbildung eines Quadruplexes (Abbildung 24). Hier konnte *in silico* der Verlust der koordinierten Kationen beobachtet werden [91]. Anschließend wurden Thymin-Transversionen der oberen und unteren Tetrade durchgeführt (AID-1-G1T und G3T), um zu untersuchen, ob eine derartige Modifikation zu einer stärkeren Destabilisierung des Quadruplexes führt (5.1.1.1). Die CD-spektroskopische Untersuchung zeigte, dass die AID-1-Variante G1T einen Quadruplex ausbildete, der im Vergleich zu einer Transversion der mittleren Tetrade (G2T, G6T, G10T, G14T) weniger stabil war (Abbildung 20a). Dies konnte aus dem Vergleich der maximalen Elliptizitätswerte abgeleitet werden. Die Variante G3T hingegen erfüllte die Quadruplex-typischen Kriterien nicht vollständig. Das Minimum bei 240 nm lag nicht im negativen Bereich (Abbildung 20b). Da jedoch das Minimum und Maximum an den Quadruplex-typischen Wellenlängen vorlag und G3T in Abwesenheit von stabilisierenden monovalenten Kationen keinen Quadruplex-typischen Kurvenverlauf zeigte, wurde davon ausgegangen, dass die Variante G3T ebenfalls als Quadruplex-Struktur vorlag. Eine Thymin-Transversion der äußeren Tertraden führte demnach zu einer verstärkten Destabilisierung der Quadruplex-Struktur als in der inneren Tetrade, jedoch nicht zur Auflösung der Struktur. Die Auswirkung der Aptamer-Modifikation dieser AID-1-Aptamer-Varianten G1T und G3T auf die Interaktion zum IL-6R wurden mittels SPR untersucht und zeigten den Verlust der IL-6R-Bindung (Abbildung 25). Die CD-spektroskopisch gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Quadruplex-Struktur stehen im Einklang mit einer Publikation, die nach Abschluss der hier dargestellten Ergebnisse veröffentlicht wurde. Kelley *et al.* untersuchten u. a. CD-spektroskopisch Varianten des HIV-Integrase-Aptamers mit identischer Sequenz zum AID-1-Aptamer. Dabei handelte es sich um Varianten, in denen eine Thymin-Transversion jeder Tetrade vorgenommen wurde (G2T, G3T und G5T). Auch hier ergaben CD-spektroskopische Untersuchungen, dass diese Varianten trotz Modifikation eine Quadruplex-Struktur ausbilden, die ebenfalls weniger stabil als das Ursprungs-Aptamer war [104]. Zudem wurden von Kelley *et al.* Deletionsvarianten untersucht, die vom 3'-Ende her eine, zwei oder drei Basen weniger aufwiesen (Tabelle 36). Die Deletion des Thyminrestes am 3'-Ende wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten als Aptamer-Variante AID-1-T identifiziert,

die im Vergleich zum AID-1-Aptamer affiner an IL-6R zu binden vermochte und CD-spektroskopisch einen stabileren Quadruplex ausbildete (5.1.1.1 und [58]). Kelley *et al.* identifizierte auch AID-1-T als stabilere Variante des Ursprungs-Aptamers. Die anderen Deletionsvarianten führten hingegen durch den Verlust eines oder zweier Guaninreste, die zur Ausbildung der Tetraden verantwortlich waren, zu einem vollständigen Verlust der Quadruplex-Struktur.

Zusätzlich wurden Adenin-Transitionen der mittleren Tetrade durchgeführt (AID-1-G6A und G6/14A). *In silico* Untersuchungen zeigten, dass die Positionierung von ein oder zwei Adeninresten an Stelle von Guaninresten dazu führte, dass die exozyklische Aminofunktion des Adenins in das Innere der Tetrade ragte und damit die Komplexbildung des Kations destabilisiert wurde (Abbildung 89a, [91]). Zusätzlich führte die Aminofunktion zum Verlust eines Protonenakzeptors, so dass der Adeninrest zur Ausbildung je einer Wasserstoffbrückenbindung zu den benachbarten Guaninresten fähig war (Abbildung 89a, [91]).



**Abbildung 89: Darstellung einer Adenin-Transition innerhalb einer G-Tetrade [91].** Dargestellt sind die Basen innerhalb einer G-Tetrade, in der ein Guaninrest durch ein Adeninrest ausgetauscht wurde. Die exozyklische Aminofunktion ragt dabei in das Innere der Tetrade. Zudem kann der Adeninrest zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Guaninresten ausbilden. Es handelt sich um eine Capped-Stick-Darstellung, in der Kohlenstoff- (weiß), Stickstoff- (blau) und Sauerstoffatome (rot) gezeigt werden und ein monovalentes Kation (grün), welches mittig über Sauerstoffatome koordiniert wird.

CD-spektroskopische Untersuchungen der AID-1-Aptamer-Varianten G6A und G6/14A zeigten, dass beide noch Quadruplexe ausbilden (Abbildung 22). Jedoch führen zwei Adenin-Transition (G6/14A) zu einer erheblichen Destabilisierung der Quadruplex-Struktur (Abbildung 22b). MD-Simulationen dieser Varianten bestätigten dieses Ergebnis und ergaben, dass die Adenin-Transition dazu führte, dass das untere Kation

zeitweise die Position verließ und sich eine Ebene darunter anlagerte (Abbildung 89b und c, [91]). In der Variante G6/14A (zweifache Adenin-Transition) war das untere Kation gar nicht mehr innerhalb des Quadruplexes lokalisiert [91]. Beide Varianten des AID-1-Aptamers wiesen keine Interaktion mit dem IL-6R auf (Abbildung 25).

In Quadruplex-ausbildenden Strukturen stellen häufig die Loopregionen die Hauptinteraktionsstellen zum Target dar. In vorherigen Arbeiten wurden jeweils alle Thyminreste durch Adeninreste ersetzt und auf die Bindung an IL-6R untersucht. Keine der AID-1-Aptamer-Varianten T4A, T8A, T12A oder T16A führte zu einem vollständigen Verlust der Bindung an IL-6R. Die Varianten T8A, T12A und T16A wiesen im Vergleich zum Ursprungs-Aptamer sogar ähnliche Dissoziationskonstanten auf [58].

Zusammenfassend ergab die Analyse der AID-1-Aptamer-Varianten, dass jeder Austausch eines Guaninestes zum Verlust der Bindung an IL-6R führte, hingegen der Austausch der Thyminreste zu einer schwächeren Bindung oder gar keine Auswirkungen hatte. Lediglich die Entfernung des Thyminrestes am 3'-Ende führte zu einer verbesserten Affinität zu IL-6R und zu einer stabileren Struktur. Die Quadruplex-Struktur an sich scheint für die Wechselwirkung mit IL-6R von entscheidender Bedeutung zu sein, da eine Destabilisierung der Struktur durch den Austausch der Guaninreste der Tetraden immer mit dem Verlust der IL-6R-Bindung einherging.

## 6.2 DNA UND RNA DERSELBEN SEQUENZ, STRUKTUR UND FUNKTION

DNA und RNA unterscheiden sich strukturell in einer Hydroxyfunktion der an 2'-Position der Ribose und in den Nucleobasen. Bezüglich der biologischen Aktivität besitzen DNA und RNA kaum Überschneidungen. Lediglich eine gemeinsame Funktion weisen sie auf, indem das Erbgut von Viren sowohl als DNA als auch als RNA vorliegen kann. Im Hinblick auf Aptamere wurden zwei beschrieben, die als DNA und auch als RNA derselben Sequenz an dasselbe Target binden konnten [92, 93]. Zusätzlich wurden diverse Quadruplex-ausbildende DNA-Stränge daraufhin untersucht, ob sie als RNA ebenfalls eine solche Struktur einnehmen [94]. Dabei wurde festgestellt, dass RNA-Stränge nur parallel-angeordnete Quadruplexe ausbilden. Es zeigte sich, dass das Thrombin-bindende Aptamer als DNA einen antiparallel-strängigen und in Form von RNA einen parallel-strängigen Quadruplex ausbildete [94]. Das HIV-Integrase-Aptamer,

das dieselbe Sequenz wie das AID-1-Aptamer aufwies, bildete als RNA-Variante eine parallel-strängige Quadruplex-Struktur.

Daraufhin wurde das AID-1-Aptamer und dessen Varianten AID-1-T, G2T, G6T, G10T und G14T *in vitro* transkribiert und die resultierende RNA auf die Funktionalität und Quadruplex-ausbildende Struktur untersucht.

Zur Untersuchung der Interaktion der RNA-Varianten des AID-1-Aptamers mit IL-6R wurden Filterbindungsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die radioaktiv markierten RNAs mit steigenden Konzentrationen an Hyper-IL-6, einem Fusionskonstrukt aus IL-6 und IL-6R, inkubiert. Es zeigte sich, dass sowohl das AIR-1-Aptamer als auch die um eine Base verkürzte Variante AIR-1-U als RNA an IL-6R gebunden haben (Abbildung 27). Die bestimmten Dissoziationskonstanten lagen für die RNA-Varianten AIR-1 ( $K_d = 0,16 \mu\text{M}$ ) und AIR-1-U ( $K_d = 0,20 \mu\text{M}$ ) im selben Bereich wie die von den DNA-Varianten (Tabelle 28: AID-1  $K_d = 0,19 \mu\text{M}$ , AID-1-T  $K_d = 0,12 \mu\text{M}$ ). Die Spezifität der Bindung der AIR-1-RNA-Varianten wurde über die Einfachvarianten (G2U, G6U, G10U, G14U) deutlich, von denen keine an IL-6R gebunden hatte (Abbildung 26). Bei diesen Varianten wurde jeweils ein Guaninrest der mittleren Tetrade gegen einen Uracilrest ausgetauscht (Tabelle 31). Im Vergleich zu Thymin fehlt Uracil eine Methylgruppe an Position 3, die bei einer Thymin-Transversion zu sterischen Hinderungen innerhalb der G-Tetrade führte. Im Falle der Uracil-Transversion, ist der Uracilrest in der Lage zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum benachbarten Guaninrest auszubilden. CD-spektroskopische Untersuchungen der AIR-1-RNA-Varianten ergaben, dass alle RNA-Varianten Quadruplex-typische Kurvenverläufe zeigten (Abbildung 28-30). Die Verwendung verschiedener Puffer zeigte zudem, dass die Ausbildung des Quadruplexes stark von Kaliumionen abhängig war. Die Uracil-Transversion innerhalb der mittleren Tetrade führte auch in Form von RNA zu Quadruplex-ausbildende Strukturen. Aufgrund der fehlenden Methylgruppe des Uracilrestes wurden für die RNA-Varianten höhere Elliptizitätswerte erwartet. Beim Vergleich der spektroskopisch gewonnenen Ergebnisse konnte zwischen den DNA- und RNA-Varianten kein Unterschied bezüglich der CD-Profile festgestellt werden. Ein Grund könnte in der Herstellung der RNA liegen, so dass Verunreinigungen o. ä. zu verringerten Elliptizitätswerten führten.

Die Ausbildung von Quadruplex-Strukturen der RNA-Varianten des AIR-1-Aptamers wurde ebenfalls in MD-Simulationsstudien bestätigt [91].

### 6.3 DIMERISIERUNG DES DNA-APTAMERS

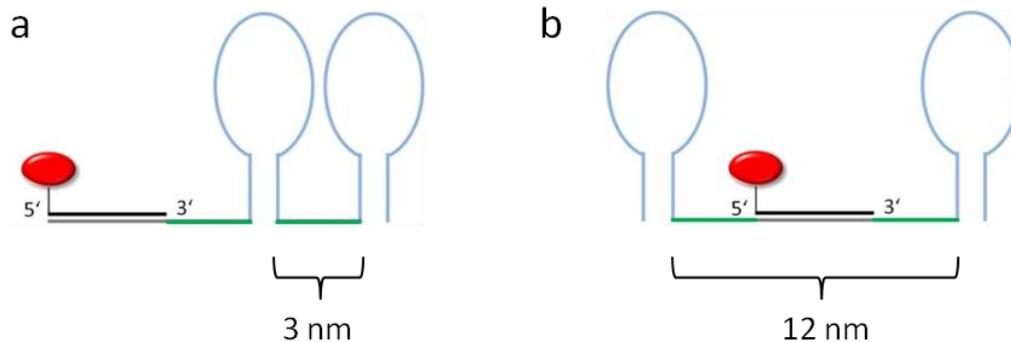
Die Dimersierung oder Multimerisierung von Aptamern wurde von anderen Arbeitsgruppen auf verschiedene Weise umgesetzt und führte beispielsweise zu einer Rezeptor-Aktivierung [96], zu inhibitorischen Effekten [107], zur Co-Stimulation von T-Zellen [95] oder bei Verwendung zweier Aptamere mit unterschiedlichen Bindungsmotiven für dasselbe Target zu verbesserten Bindungseigenschaften [108].

In vorherigen Arbeiten wurde das AID-1-Aptamer am 3'-Ende mit dem Farbstoff Alexa488 markiert, wobei durchflusszytometrisch keine Bindung an IL-6R-tragende Zellen nachgewiesen werden konnte [58]. Vermutet wurde, dass die Eigenfluoreszenz der Zellen im grünen Spektralbereich die Bindung der grün-fluoreszierenden Markierung am Aptamer überdeckt haben könnte (Abbildung 33, [58]). Zudem wurde in vorherigen Arbeiten die Dissoziation der Aptamere AIR-3A und AID-1 bestimmt, wobei AID-1 im Vergleich schneller vom Rezeptor dissoziierte [57, 58]. In dieser Arbeit sollten verbesserte Bindungseigenschaften des AID-1-Aptamers zum IL-6R generiert werden, die zur Bindung an IL-6R-tragende Zellen führen sollten. Dies sollte durch eine Dimersierung des AID-1-Aptamers vorgenommen werden.

Zur Fluoreszenzmarkierung des Aptamers wurde eine Methode gewählt, die es ermöglichte, diverse Dimer zu untersuchen, ohne diese jeweils direkt fluoreszenzmarkieren zu müssen. Dazu wurde das Aptamer am 3'-Ende um insgesamt 28 Nucleotide verlängert, an die eine fluoreszenzmarkierte RNA dann hybridisieren konnte (5'-Monomer). Basierend auf diesem Konstrukt, wurden Dimere des AID-1-Aptamers hergestellt (Abbildung 90).

Durchflusszytometrische sowie mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass zwei Dimere des AID-1-T-Aptamers an IL-6R-tragende Zellen gebunden haben. Das 5'-Monomer hatte nicht an den IL-6R gebunden. Die Dimere unterschieden sich bezüglich Konstruktion und Bindung voneinander. Das 5'-Dimer setzte sich aus zwei AID-1-T-Monomeren zusammen, die über 9-nt verbunden waren. Am 3'-Ende wurde das Aptamer um weitere 9-nt und um den Strang, der komplementär zur fluoreszenzmarkierten RNA war, verlängert (Abbildung 90 und Tabelle 6). Das

Dimer2Side bestand ebenfalls aus zwei AID-1-T-Aptameren, jedoch wurde zwischen die Aptamere der DNA-Strang positioniert, der mit der fluoreszenzmarkierten RNA hybridisieren konnte (Abbildung 90 und Tabelle 6).



**Abbildung 90: Dimer-Varianten des AID-1-Aptamers.** Das AID-1-T-Aptamer wurde dimersiert, indem zwischen zwei Aptamere ein 9-nt langer Linker eingesetzt wurde. Die Markierung erfolgte über Hybridisierung eines fluoreszenzmarkierten RNA-Stranges, der entweder am 3'-Ende (a) oder zwischen zwei Aptameren (b) positioniert wurde. Die resultierenden Abstände zwischen den Aptameren sind angegeben. Dazugehörige Sequenzen sind Tabelle 6 zu entnehmen. 5'-Atto647N-markierte RNA (schwarz), AID-1-T-DNA-Aptamer (hellblau), Linker (grün).

Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab, dass das Dimer2Side-Konstrukt besser als das 5'-Dimer an IL-6R-tragende Zellen gebunden hatte (5.1.5.2). Die Spezifität der Bindung des Dimer2Side an IL-6R-tragende Zellen wurde über die Verdrängung des Dimer2Side durch das RNA-Aptamer AIR-3A verifiziert. Es konnte sogar gezeigt werden, dass das Dimer2Side mit in die Zelle internalisiert wurde (5.1.5.5).

SPR-Untersuchungen offenbarten, dass die Dimerisierung in Form des Dimer2Side im Vergleich zum ursprünglichen Aptamer AID-1 zu einer verlangsamten Dissoziation vom IL-6R führte (5.1.5.6). Sechs Minuten nach Abschluss des Probenauftrages dissoziierten nur 20% des gebundenen Aptamers vom IL-6R. In derselben Zeitspanne dissoziierte das Aptamers AID-1 vollständig vom Rezeptor (Abbildung 43). Um diese verbesserte Wechselwirkung der Dimere zum Rezeptor nachzuvollziehen, wurde die Konstruktion der Dimere näher betrachtet. Hauptsächlich unterschieden sich die beiden Dimere im Abstand zwischen den einzelnen Aptameren. Im 5'-Dimer waren es 9 einzelsträngige Nucleotide, die einer Länge von etwa 3 nm entsprachen. Im Dimer2Side hingegen wurden die Aptamere insgesamt durch 18 einzelsträngige Nucleotide und den Doppelstrang, der aus 19-nt bestand, voneinander auf Abstand gehalten. Dies entsprach etwa einer Länge von insgesamt 12 nm, wobei dabei zu beachten war, dass der doppelsträngige Bereich bezüglich der Flexibilität starrer als der einzelsträngige Bereich war. Der dadurch sich ergebene Abstand der Aptamere zueinander im Dimer2Side-

Konstrukt, muss die verbesserte Wechselwirkung zum Rezeptor bewirkt haben. Über den Grund der verlangsamten Dissoziation vom Rezeptor kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Die Bindung beider Aptamere könnte zur verbesserten Wechselwirkung zum Rezeptor geführt haben. Unter dieser Voraussetzung, könnten zum einen die beiden Aptamere des Dimers an denselben Rezeptor gebunden haben. Dies würde jedoch zwei Bindungsstellen an einem IL-6R-Molekül erfordern. Diese Bindungsstellen müssten dann ebenfalls in etwa 12 nm Entfernung zueinander liegen. Wobei dieser Abstand durch die flexiblen, einzelsträngigen Bereiche auch kürzer vorliegen könnte. Da das 5'-Dimer ebenfalls an den Rezeptor binden konnte, müssten dieser Abstand so gering sein, dass die flexible Ausrichtung über den 9-nt Linker die Bindung beider Aptamere ermöglichte. Eine alternative Möglichkeit für die verlängerte Dissoziationszeit vom IL-6R könnte darin begründet sein, dass die Aptamere an zwei verschiedene Rezeptoren gebunden haben. Dies würde wiederum bedingen, dass der Abstand der Rezeptoren zueinander im Durchschnitt optimal zur Assoziation des Dimer2Side-Konstrukts war. Diese Anordnung der Rezeptoren müsste auf den IL-6R-tragenden Zellen sowie auf dem SPR-Chip gleich gewesen sein, um dieselben Effekte zu beobachten. Dies war praktisch unmöglich und wurde als Grund für die verbesserte Bindung ausgeschlossen.

## **6.4 INTERAKTION DER APTAMERE MIT IL-6R-TRAGENDEN ZELLEN**

### **6.4.1 BINDUNG DER APTAMERE AN IL-6R-TRAGENDE ZELLEN**

Die spezifische Bindung der RNA- als auch DNA-Aptamere an IL-6R wurde in vorherigen Arbeiten analysiert. Anhand von Gelshift-Assays konnte gezeigt werden, dass das RNA- und das DNA-Aptamer seitens des Rezeptors um dieselbe Bindungsstelle konkurrierten [57, 58]. Die Bindung an IL-6R-tragende Zellen wurde hauptsächlich mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen und konnte zur Verifizierung durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Die Grundvoraussetzung dieser Untersuchungen war die Fluoreszenzmarkierung des Aptamers. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Methoden verwendet. Die direkte kovalente Verbindung des Fluorophors mit dem Aptamer hatte den Vorteil, dass das Fluorophor aufgrund seiner relativ geringen Größe die Interaktion mit dem IL-6R nicht beeinträchtigen sollte. Um in einem schnellen Verfahren viele verschiedene Aptamer-

Varianten mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen, war die direkte Fluoreszenzmarkierung zu kostenintensiv. Aufgrund dessen wurden die zu untersuchenden Aptamere mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonucleotid hybridisiert (5.1.5.2). Nachteilig an dieser Methode war, dass dazu das Aptamer um mindestens 19 Nucleotide verlängert werden musste, was gegebenenfalls die Eigenschaften des Aptamers beeinflusst haben könnte. Eine weitere angewandte Methode zur Fluoreszenzmarkierung von Aptameren, bestand darin, Streptavidin-Biotin-Konjugate zu bilden, die sich sowohl aus Aptameren als auch aus Fluorophoren zusammensetzten (5.4.2.6). Im Vergleich zu den anderen vorgestellten Methoden zur Fluoreszenzmarkierung bestand der Vorteil dieser Markierung darin, zu untersuchen, ob das Aptamer immer noch in der Lage war, an IL-6R-tragenden Zellen zu binden, wenn es um ein zehnfaches größer ist.

Das RNA-Aptamer AIR-3A konnte nachweislich an IL-6R-tragende Zellen binden. Um eine unspezifische Interaktion mit den Zellen auszuschließen, wurden das AIR-3A-Aptamer sowie die nicht-bindende Variante AIR-3A-G17U auf die Bindung an diverse Zelllinien hin untersucht.

Die murinen Baf-Zellen waren mit einem Vektor stabil transfiziert, der die Oberflächenproteine gp130 und IL-6R kodiert. Als Kontrollzellen wurden murine Baf-Zellen verwendet, die nur mit dem gp130-Vektor stabil transfiziert waren. Es konnte gezeigt werden, dass das RNA-Aptamer AIR-3A spezifisch nur an die IL-6R-tragenden Baf-Zellen gebunden hatte [57, 97]. Es folgte die Analyse von Zellen, die den IL-6R nativ auf der Zelloberfläche produzierten. Dazu wurden HeLa-, HepG2- und U937-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Diese drei Zelllinien tragen pro Zelle unterschiedlich viele IL-6R auf der Oberfläche. HeLa-Zellen weisen 50 - 100, HepG2-Zellen 500-2000 und U937-Zellen 2800 IL-6R pro Zelle auf [11, 85, 109]. Bestimmt wurde die Anzahl der Rezeptoren über die Bindung von radioaktiv markierten IL-6 ( $^{125}\text{I}$ -IL-6). Gebundenes  $^{125}\text{I}$ -IL-6 wurde als Funktion der  $^{125}\text{I}$ -IL-6-Konzentration aufgetragen und die Daten nach der Methode von Scatchard analysiert, um die Anzahl der Bindungsstellen zu bestimmen [11, 85, 109]. Wie viele IL-6R die Baf-Zellen auf der Oberfläche trugen war nicht bekannt und könnte durch die genannte Methode bestimmt werden.

Der von der Aptamerbindung unabhängige Nachweis des IL-6Rs auf den IL-6R-tragenden Zellen erfolgte über Antikörper. Die Anzahl der IL-6R auf HeLa-Zellen war zu

gering, um mittels Antikörpern detektiert werden zu können. Aufgrund dessen konnte offensichtlich auch die Bindung des RNA-Aptamers AIR-3A an HeLa-Zellen mittels Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen werden (5.2.2.5). Im Gegensatz zu den HeLa-Zellen tragen die Leber-Zellen HepG2 zehnmal mehr IL-6R auf der Oberfläche. An diese Zellen haben sowohl das RNA-Aptamer AIR-3A als auch die Kontroll-Variante AIR-3A-G17U gebunden. Um das verwendete Fluorophor Atto647N als Interaktionspartner der Zellen auszuschließen, wurde stattdessen das Fluorophor Cy5 verwendet. Dies führte dennoch zur Bindung beider RNAs. Selbst der Versuch, unspezifische Interaktionen über tRNAs abzusättigen, scheiterte (5.2.2.6). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit keine Bindungsanalysen mit den HepG2-Zellen durchgeführt. Um dennoch eine spezifische Bindung des AIR-3A-Aptamers nachzuweisen, könnten Aptamer-vermittelte Internalisierungs-Experimente durchgeführt werden, wobei das Kontroll-Aptamer zu keiner Internalisierung führen sollte. Hierfür sollte zur Entfernung von außen gebundener RNA RNase verwendet werden, da Trypsin zu einer sofortigen Lyse der Zellen geführt hätte. Die spezifische Bindung des RNA-Aptamers AIR-3A an U937-Zellen konnte hingegen nachgewiesen werden (Abbildung 50). Daraufhin wurden steigende Konzentrationen des AIR-3A-Aptamers zu den IL-6R-tragenden U937-Zellen gegeben und durchflusszytometrisch analysiert. Die graphische Auswertung zeigte eine gesättigte Kurve, mittels der ein „pseudo  $K_d$ “ von 77 nM bestimmt werden konnte (Abbildung 51). Damit konnte bewiesen werden, dass das Aptamer AIR-3A mit gleicher Affinität sowohl den sIL-6R als auch zellständigen IL-6R auf U937-Zellen (40 nM) binden konnte. Es zeigte sich allerdings, dass das Kontroll-Aptamer AIR-3A-G17U bei steigenden Konzentrationen ebenfalls an die Zellen gebunden hatte. Die resultierende Bindungskurve stieg linear mit der verwendeten RNA-Menge an (Abbildung 51). Eine  $K_d$ -Bestimmung ergab für AIR-3A-G17U einen Wert von 1,1  $\mu$ M, der damit um ein 14-faches schlechter als der des AIR-3A-Aptamers war (5.2.2.4). Um eine spezifische Bindung des Kontroll-Aptamers an die Zellen auszuschließen, wurde die Internalisierung des Aptamers AIR-3A und der Variante AIR-3A-G17U untersucht. Die Internalisierung des IL-6R wurde über eine Temperaturerhöhung auf 37 °C induziert und von außen gebundenes Aptamer enzymatisch entfernt. Dabei wurde zuvor gebundenes Kontroll-Aptamer AIR-3A-G17U vollständig von den Zellen entfernt, was bewies, dass es sich bei der Bindung von AIR-3A-G17U um eine unspezifische Interaktion mit Komponenten der U937-Zelloberfläche handelte (5.2.4.2). Vermutlich

würden höhere Konzentrationen an AIR-3A ebenfalls zu unspezifischen Wechselwirkungen mit U937-Zellen führen.

#### **6.4.2 INTERNALISIERUNG DER APTAMERE DURCH IL-6R-TRAGENDE ZELLEN**

Rezeptoren unterliegen laufend Recycling- und Regulationsprozessen, in denen diese internalisiert werden. Die Internalisierung von Rezeptoren kann über eine Temperaturerhöhung auf 37 °C induziert und durch Temperatur-Erniedrigung inhibiert werden. Der Internalisierungsprozess des IL-6R wurde über <sup>125</sup>I-IL-6 nachgewiesen, das in der Zelle nachgewiesen werden konnte [11, 85].

Die Internalisierung der IL-6R-bindenden Aptamere wurde in dieser Arbeit untersucht. Zur Unterscheidung von internalisierten und an der Zelloberfläche gebundenen Aptameren, wurden die Zellen enzymatisch behandelt, so dass die Aptamere auf der Zelloberfläche entfernt wurden. Dazu wurde zum einen Trypsin verwendet, das zur unspezifischen Proteolyse führte und dabei u. a. den IL-6R von der Oberfläche abspaltete. Nachteilig an der Trypsin-Behandlung war der unspezifische Protein-Abbau, der bis zur Lyse der Zelle führen könnte. Zum anderen wurde das RNA-Aptamer an der Zelloberfläche mittels RNase T1 degradiert.

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Aptameren ermöglichte es, die Internalisierung des Aptamers durchflusszytometrisch zu untersuchen und mittels Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren.

Der durchflusszytometrische Nachweis der Rezeptor-vermittelten Aptamer-Internalisierung erfolgte durch den Vergleich von IL-6R-tragenden Zellen die mit dem Aptamer versetzt und bei 37 °C oder auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurde auf der Zelloberfläche befindliches Aptamer enzymatisch entfernt und die Zellen auf ihre Fluoreszenz untersucht. Voraussetzung für den Vergleich der Versuchsansätze untereinander war die temperaturunabhängige Interaktion der fluoreszenzmarkierten Aptamere mit IL-6R-tragenden Zellen.

Der Einsatz konfokaler Mikroskopie ermöglichte die Fluoreszenzdetektion innerhalb einer 5 µm dicken Ebene als Schnitt durch die Zelle. Auf Eis inkubierte Zellen zeigten die Aptamer-Bindung als fluoreszierenden Ring um die Zelle, der nach der Enzym-Behandlung verschwand (Abbildung 57). Die Inkubation bei 37 °C führte zur Translokation der Aptamere, die als Fluoreszenz im Zellinneren zu sehen war und auch

nach der enzymatischen Behandlung nicht verschwand. Untermuert wurden diese Ergebnisse in einer durchflusszytometrischen Analyse (Abbildung 56). Beobachtet wurde, dass die auf Eis inkubierten Versuchsansätze nach der enzymatischen Behandlung kaum fluoreszierten. Im Gegensatz dazu verloren die bei 37 °C inkubierten Zellen ebenfalls an Fluoreszenzintensität, jedoch nicht so gravierend. Das heisst, dass die Zellen, die nicht enzymatisch behandelt wurden, am stärksten fluoreszierten. Die Zellen, die bei 37 °C inkubiert und enzymatisch behandelt wurden, wiesen die zweitstärkste Fluoreszenz auf. Die geringste Fluoreszenz wiesen die Zellen auf, die auf Eis inkubiert wurden und enzymatisch behandelt wurden. Die nach enzymatischer Behandlung Fluoreszenz der Zellen, die bei 37 °C inkubiert wurden, beweist die Internalisierung des Aptamer-Rezeptor Komplexes.

Diese Rezeptor-vermittelte Internalisierung konnte sowohl für das RNA-Aptamer AIR-3A (5.2.4), das tetramere AIR-3A-Streptavidin-Konjugat (5.4.2.2) als auch für die AID-1-Variante Dimer2Side (5.1.5.5) in Baf\_gp130\_hIL-6R- und U937-Zellen nachgewiesen werden.

Anzumerken ist, dass der Prozess der Internalisierung der Aptamere in Abwesenheit des Zytokins IL-6 stattfand und somit Zytokin unabhängig erfolgte. Außerdem wurde durch die Internalisierung der Aptamere nicht das IL-6-Signaling in Gang gesetzt (6.6). Dies bedeutet, dass der IL-6R entgegen bisherigen Kenntnissen konstitutiven Internalisierungsprozessen unterworfen ist. In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass der IL-6R Zytokin-vermittelt internalisiert wird und diese IL-6/IL-6R-Internalisierung von gp130 abhängig ist [12]. gp130 selbst wird unabhängig von einer IL-6-Bindung internalisiert und führt dabei in der Zelle nicht zum IL-6-Signaling [110, 111].

## **6.5 VERWENDUNG DES IL-6R-BINDENDEN APTAMERS ZUR REZEPTOR-VERMITTELTEN INTERNALISIERUNG**

Aptamere, die spezifisch an Rezeptoren binden, können als sogenannte *Carrier* dienen [56]. Die zellspezifische Aptamer-vermittelte Internalisierung eröffnet die Möglichkeit eine beliebige Substanz an das Aptamer zu koppeln und mit ins Innere der Zelle zu transportieren. Die Wirkung der Substanz am Aptamer hängt davon ab, ob die Bindung zum Rezeptor gewährleistet ist, die Substanz mit internalisiert wird und die Substanz aus dem Endosom in das Zytosol gelangt, um eine Funktion auszuüben. Die Rezeptor-vermittelte Internalisierung unter Verwendung eines Fusionsproteins wurde in der Literatur beschrieben. Das Fusionsprotein setzte sich aus dem Zytokin IL-6 und Diphtheriatoxin zusammen. Die zytotoxische Wirkung konnte spezifisch für IL-6R-tragende Zellen gezeigt werden [112]. In dieser Arbeit wurde versucht Toxine, fluoreszierende Proteine, sowie siRNAs an das RNA-Aptamer zu koppeln und Aptamer-vermittelt in die Zelle zu bringen.

### **6.5.1 KONJUGATION DES IL-6R-BINDENDEN RNA-APTAMERS MIT TOXINEN UND FLUORESZIERENDEN PROTEINEN**

Nucleinsäuren können kovalent durch den Einsatz von Crosslinkern an Proteine gebunden werden, wobei der Crosslinker als Verbindungsstück zwischen Protein und Nucleinsäure verbleibt [47]. Seitens des Proteins können beispielsweise primäre Amine, Thiole oder Carboxyle als Angriffspunkte dienen. Die Nucleinsäure muss ebenfalls funktionalisiert vorliegen. Die Wahl des Crosslinkers bezieht sich auf die zu verknüpfenden funktionellen Gruppen. Handelt es sich um gleichartige funktionelle Gruppen, so können homobifunktionale Crosslinker verwendet werden, die in einem Schritt Nucleinsäure und Protein verbinden. Diese Art von Crosslink ist ungerichtet, da die Komponenten auch untereinander reagieren können. Sofern das Protein und die Nucleinsäure über verschiedene funktionelle Gruppen verbunden werden sollen, können heterobifunktionale Crosslinker verwendet werden. Dies hat den Vorteil, dass die Reaktionen des Crosslinkers mit dem Protein und der Nucleinsäure nacheinander in getrennten Reaktionen durchgeführt wird und es somit nicht zu ungewollter Homodimerisierung kommt. Nachteilig beider Crosslinker sind die geringen Ausbeuten und die hohe Hydrolyse-Empfindlichkeit.

Das RNA-Aptamer AIR-3A sollte über den Crosslinker DSS an Proteine gebunden werden. DSS ist ein homobifunktionaler Crosslinker, der zur Reaktion mit primären Aminen führt. Dazu wurde das Aptamer am 5'-Ende über einen C<sub>8</sub>-Linker verlängert, der eine endständige Aminogruppe trug und seitens des Proteins wurde die Seitenkettenaminofunktion von Lysinen angegriffen. Als Proteine sollten das zytotoxische Gelonin und fluoreszierende Protein-Varianten des DsRed verwendet werden.

Die fluoreszierenden Protein-Varianten mRFP1, mCherry und TDimer wurden in *E. coli* rekombinant produziert und über Affinitätschromatographie gereinigt (5.4.4). Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft und die fluoreszierenden Proteine zusätzlich immunologisch über den His-Tag identifiziert (Abbildung 84). Die jeweiligen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen wurden schließlich mittels 3D-Fluoreszenz-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 86). Das TDimer-Protein konnte nicht in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden, so dass mit den Proteinen mRFP1 und mCherry weiter gearbeitet wurde. Es folgte der DSS-Crosslink der fluoreszierenden Proteine mit dem AIR-3A-Aptamer. Der Erfolg des Crosslinking wurde über die Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde durchgeführt, die komplementär zum AIR-3A-Aptamer war. Obwohl seitens des Proteins 18 potenzielle Lysinreste mit dem Crosslinker reagieren könnten, war der Anteil an verbundenem Aptamer und Protein, sehr gering. Der Crosslink konnte nicht nach erfolgter SDS-PAGE mittels Silberfärbung nachgewiesen werden.

Demgegenüber stand der Crosslink des AIR-3A-Aptamers mit dem toxischen Gelonin. Die Toxizität des Gelonins wurde über eine Proteintransfektion nachgewiesen. Dabei erwiesen sich HepG2-Zellen und U937-Zellen für die verwendete Proteintransfektion als ungeeignet. HepG2-Zellen nahmen weder das Kontroll-Protein noch das Toxin auf und auf U937-Zellen wirkte sich die Transfektion letal aus. Gegebenenfalls könnte die Verwendung einer alternativen Transfektionsmethode zum Erfolg führen. Zusätzlich wurden Toxizitätstests mit HeLa-Zellen durchgeführt und eine Menge von 25 ng Gelonin auf 20.000 Zellen in 100 µL Medium bestimmt, die sich nach einer zweitägigen Inkubation die Zellproliferation herabsetzte (5.4.3.1).

Gelonin wurde mittels DSS an das AIR-3A-Aptamer und dessen nicht-bindenden Varianten AIR-3A-G17U und AIR-3A\_Shuffle gecrosslinked. Seitens des Gelonins, waren

potenziell 18 Lysinreste der Reaktion mit DSS zugänglich. Das Ergebnis des Crosslinking konnte wie bei den fluoreszierenden Proteinen nicht über SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung nachgewiesen werden. Jedoch konnte der Erfolg des Crosslinking von Aptamer und Toxin über eine komplementäre radioaktiv markierte Sonde nachgewiesen werden (5.4.3). Aufgrund der geringen Ausbeute mit dem Crosslinker DSS wurden die heterobiofunktionalen Crosslinker Sulfo-SMCC und SPDP verwendet, die an einem Ende mit dem Aptamer über das primäre Amin reagieren konnten und am anderen Ende mit einer Thiolgruppe. Zur Reaktion mit einem Thiol musste die Disulfidbrücke des Gelonins zuvor über Reduktion mit DTT zugänglich gemacht werden. Dadurch ergaben sich prinzipiell zwei mögliche Angriffsstellen für den Crosslinker. Der Erfolg des Crosslinking konnte in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung nachgewiesen werden. Die Reaktion mit Sulfo-SMCC führte zu einer zusätzlichen 36 kDa Protein-Bande, die der Größe des Gelonins mit einem Aptamer entsprachen.

Der Nachweis des Aptamers am Gelonin erfolgte über die Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde spezifisch für das Aptamer und der Vergleich der Reaktionsansätze mit den Crosslinkern DSS, Sulfo-SMCC und SPDP zeigte, dass Sulfo-SMCC am effektivsten zur Reaktion zwischen Aptamer und Toxin führte. Der Anteil des Crosslinking mittels Sulfo-SMCC konnte mit 16% bestimmt werden (Abbildung 80b). Es folgte der Versuch, das Crosslink-Produkt vom Gelonin über Affinitätschromatographie zu trennen. Durch die Verwendung verschiedener Puffer mittels Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie sollte versucht werden, die Komponenten zu trennen. Dabei erwies sich bereits die Detektion des Gelonins als schwierig, da es kaum zu detektieren war. Die Detektion des Proteins über die Peptidbindungen bei 230 nm erwies sich ebenso als problematisch, da in dem Wellenlängenbereich viele weitere Substanzen wie beispielsweise der Crosslinker selbst detektiert wurden. Die Trennung der Komponenten wurde lediglich analytisch angegangen, wofür mit kleinsten Mengen (30  $\mu$ L) des Reaktionsansatzes gearbeitet wurde. Die Etablierung einer präparativen Reinigung müsste in einem weit größeren Maßstab erfolgen.

Zur Untersuchung der Aptamer-vermittelten zellspezifischen Internalisierung des Aptamer-Gelonin-Konjugates wurden IL-6R-tragende Zellen mit dem Gemisch aus Gelonin und Aptamer-Gelonin-Konjugat versetzt, unter der Voraussetzung, dass das Gelonin selbst nicht toxisch auf die Zellen wirkte. Als Kontrollen dienten Zellen ohne

Toxin, das Gelonin und das zellgängige Toxin Cycloheximid. Nach drei Tagen wurden die Zellen auf ihre Proliferation hin untersucht. Es zeigt sich, dass das Aptamer-Gelonin-Konjugat keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatte (Abbildung 83). Obwohl das Aptamer-Konjugat im 4-fachen molaren Überschuss zu den verwendeten Zellen eingesetzt wurde und das Gelonin innerhalb der Zelle enzymatisch wirken sollte, konnte kein Effekt beobachtet werden.

Offen blieb die Frage, ob das Aptamer am Gelonin gebunden, überhaupt noch in der Lage war, an die IL-6R-tragenden Zellen zu binden. Die Bindung an sIL-6R könnte in Form von Hyper-IL-6 in einem Gelshift-Assay überprüft werden. Um die Bindung des Konjugates an die IL-6R-tragenden Zellen und die Internalisierung nachzuweisen, könnte ein Aptamer verwendet werden, das am 5'-Ende aminomodifiziert und am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert wäre. Das würde den Crosslink mit Gelonin und eine durchflusszytometrische oder mikroskopische Untersuchung der Zellen ermöglichen. Gleichzeitig könnte dadurch die Lokalisation des Konjugates innerhalb der Zelle visualisiert werden. Außerdem müsste geklärt werden, ob das Gelonin nach der Verbindung zum Aptamer überhaupt toxisch wirken kann. Um das herauszufinden, müsste das Aptamer-Gelonin-Konjugat gereinigt vorliegen und dann Zellen damit transfiziert werden. Mit Hilfe des Strukturmodells von Gelonin wurde geklärt, dass die Position der Disulfidbrücke nicht im aktiven Zentrum lag. Chu *et al.* war es möglich, ein Aptamer mit Gelonin unter der Verwendung des Crosslinkers SPDP kovalent zu verbinden, zu reinigen und Rezeptor-vermittelt in Zellen zu bringen [47]. Der Vorteil des Crosslinkers SPDP liegt in der reversiblen Thiolbindung zwischen Aptamer und Gelonin, die innerhalb der Zelle reduziert wird. Aus diesem Grund sollte auch in diesem Fall der Crosslinker SPDP verwendet werden und dazu die Reaktionsbedingungen optimiert werden.

### 6.5.2 KONJUGATION DES IL-6R-BINDENDEN APTAMERS MIT siRNAs

Das Aptamer könnte als Therapeutikum verwendet werden, um in bestimmte regulatorische Zellprozesse einzugreifen. Dazu könnten regulatorische RNAs (siRNAs) an das RNA-Aptamer gekoppelt werden, um mit in das Zellinnere zu gelangen. Dabei wird der Mechanismus der RNA-Interferenz genutzt, indem siRNAs von Enzymen erkannt werden und dazu führen, komplementäre mRNAs abzubauen. Es sind bereits einige Aptamer-siRNA-Konjugate bekannt, die Rezeptor-vermittelt internalisiert wurden und zur Regulation der entsprechenden Gene führten [42, 44-46]. Zur Konjugation von Aptameren und siRNAs wurden erfolgreich verschiedene Methoden verwendet. In dieser Arbeit wurde versucht, das Aptamer mit der siRNA in einem RNA-Strang zu transkribieren. Dabei sollte die Hybridisierung der siRNA dazu führen eine Haarnadelschleife auszubilden, die aus dem RNA-Aptamer bestand. Leider führte die T7-Transkription zu Transkripten, die um ca. 20 bp zu kurz waren. Auch Variationen der Versuchsbedingungen führten nicht zu Transkripten mit der erwarteten Größe (5.4.1).

Daraufhin wurde eine alternative Methode gewählt, in der Biotin-Streptavidin-Konjugate gebildet werden sollten, die sich aus dem IL-6R-bindenden Aptamer und siRNAs zusammensetzen (Abbildung 73). Dazu wurde die bereits veröffentlichte siRNA PLK1 ausgewählt, bei der die Aptamer-vermittelte Internalisierung gezeigt werden konnte [46]. Um die Bindung aber auch die Internalisierung des Konjugates zu überprüfen, wurden anstatt der siRNAs Fluoreszenzfarbstoffe in das Konjugat integriert (Abbildung 64). Mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie konnte die Bindung und Internalisierung des Konjugates nachgewiesen werden (Abbildung 67). Um die Funktionalität der siRNA zu untersuchen, wurden IL-6R-tragende Zellen mit der biotinylierten siRNA und der siRNA als tetrameres Streptavidin-Konjugat transformiert und PLK1 immunologisch nachgewiesen. Das Ergebnis des Western-Blots erwies sich als widersprüchlich, da in den Zellen, die ohne siRNA transformiert wurden PLK1 nachweisbar war und hingegen in unbehandelten Zellen nicht (Abbildung 72). Diese Diskrepanz müsste über die Wiederholung des Versuches aufgehoben werden. Um dennoch den Versuch auszuwerten, wurden die Zellen, die unter denselben Versuchsbedingungen behandelt wurden, miteinander verglichen. Die biotinylierte siRNA führte zu einer signifikanten Verringerung der PLK1-Produktion. Das PLK1-siRNA-Streptavidin-Konjugat führte zwar auch zu einer verminderten PLK1-Produktion, jedoch im Vergleich nicht so markant wie die biotinylierte siRNA (Abbildung 72). Ein

Grund für den unterschiedlichen Effekt der siRNAs könnte sein, dass die Streptavidin-Konjugation zu sterischen Hinderungen führte, die es Dicer erschwerten, die siRNA enzymatisch anzugreifen. Eine Verlängerung des Linkers könnte zur Verbesserung der Zugänglichkeit für Dicer führen. Ein anderer Grund könnte in der Konstruktion der siRNA liegen, da Modifikationen zu einer verminderten RNA-Interferenz führen können [113, 114]. Chu *et al.* konjugierten das Rezeptor-bindende PSMA-Aptamer mit siRNA über Streptavidin und untersuchten dazu zwei verschiedene siRNAs. Beide siRNAs wurden am 5'-Ende des Sense-Stranges biotinyliert, wobei bei einer siRNA zusätzlich eine reversible Thiolverbindung hinzugefügt wurde, die innerhalb der Zelle zur Abspaltung der siRNA vom Streptavidin-Konjugat führte. Beide siRNAs als Streptavidin-Konjugat führten zu gleich starken RNAi-Antwort [46]. Aufgrund dessen wurde ein Fehler in der Konstruktion der verwendeten siRNA ausgeschlossen.

Anschließend wurden IL-6R-tragende Zellen mit den Aptamer-Streptavidin-siRNA-Konjugaten inkubiert, um die Aptamer-vermittelte Internalisierung über RNAi nachzuweisen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen, Streptavidin-Konjugate bestehend aus der nicht-bindenden Aptamer-Variante AIR-3A-G17U sowie der siRNA und weitere Streptavidin-Konjugate, die sich nur aus siRNA, Aptamer oder der nicht-bindenden Variante zusammensetzten. Der immunologische Nachweis des PLK1 zeigte, dass die PLK1-Produktion durch keines der verwendeten Konjugate beeinträchtigt wurde (Abbildung 74). Im Gegensatz zum Vorversuch konnte in unbehandelten Zellen PLK1 nachgewiesen werden.

Die Herunterregulierung von PLK1 würde voraussetzen, dass das AIR-3A-Streptavidin-PLK1-siRNA-Konjugat an humane IL-6R-tragende Zellen bindet, ins Zellinnere internalisiert wird, die PLK1-siRNA unbeschadet ins Zytosol gelangt und die RNA-Interferenz-Maschinerie in Gang gesetzt wird. Jeder einzelne oder mehrere dieser genannten Schritte könnten der Schwachpunkt dieses Versuches gewesen sein. Ungeklärt bleibt immer noch der Mechanismus, der zum unbeschadeten Ausbruch der Konjugate aus dem Endosom in das Zytosol führt. Der Abbau der RNA könnte durch die Verwendung von 2'-Fluoropyrimidin-modifizierten Nucleobasen erheblich verringert werden. Frau Dr. Kaja Eydelor identifizierte in Rahmen ihrer Dissertation 2'-Fluoropyrimidin-modifizierte Varianten des RNA-Aptamers AIR-3A, die trotz der Modifikation an den IL-6R binden konnten [97]. Ebenso kann der Sense-Strang der

PLK1-siRNA durch den Einbau von 2'-Fluoropyrimidin-modifizierten Nucleobasen verringert werden, ohne die biologische Aktivität zu beeinflussen [43].

## 6.6 EINFLUSS DER APTAMERE AUF DAS IL-6-SIGNALING

Ein Aptamer, das spezifisch an den OX40-Rezeptor bindet, führte in der dimeren Form zur Aktivierung des Rezeptors, der bekanntermaßen durch Multimerisierung auf der Zelloberfläche aktiviert wird [96]. Ein anderes Aptamer wiederum führte zur erhöhten Proliferation der Zellen durch Bindung an den 4-1BB-Rezeptor [95].

Daraufhin wurden das IL-6R-bindende Dimer2Side-Aptamer, 5'-Dimer sowie das RNA-Aptamer AIR-3A mit IL-6R-tragenden Zellen inkubiert und das IL-6-Signaling betrachtet. Im natürlichen IL-6-Signaling führt die Stimulation über das Zytokin IL-6 zur Assoziation des IL-6R mit dem Signalüberträger gp130. Anschließend erfolgt interzellulär die Signalkaskade in der als Erstes JAKs phosphoryliert werden, die wiederum zur Phosphorylierung von STAT3 führen. pSTAT3 kann immunologisch nachgewiesen werden. Dazu wurden U937-, HepG2-Zellen mit dem AIR-3A-Aptamer und Baf\_gp130\_hIL-6R-Zellen mit dem Dimer2Side und 5'-Dimer sowie deren nicht-bindenden Varianten inkubiert und pSTAT3 mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (5.1.5.7). Die Auswertung des Western-Blots ergab, dass beide Dimere und das AIR-3A-Aptamer nicht zur Phosphorylierung von STAT3 führten (Abbildung 73). Die untersuchten Aptamere führten somit nicht zum IL-6-Signaling.

Inwiefern das Dimer2Side an den IL-6R bindet ist unklar. Falls innerhalb des Dimer2Side-Konstrukts, je ein Aptamer einen Rezeptor binden würde, würde dennoch die Assoziation zum Signalüberträger gp130 fehlen. Die Assoziation von zwei Rezeptoren alleine führte nicht zur Aktivierung des IL-6-Signalweges.

Hohe Konzentrationen an IL-6 bzw. sIL-6 führen zur Bildung eines hexameren Komplexes bestehend aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R und gp130 [8]. Diese hexamere Assoziation des IL-6-Komplexes führt zu einer verminderten biologischen Antwort durch das Zytokin [9]. Auf dieser Tatsache begründete sich die Idee, dass die Bindung des Dimer2Side-Aptamers zu Ausbildung von Hyper-IL-6-Dimeren führen könnte. Dieser Komplex aus je zwei IL-6 und IL-6R verbunden über ein Dimer2Side-Aptamer wäre theoretisch in der Lage gp130 auf Zelloberflächen zu binden, da das AID-1-Aptamer nicht an die D3-Domäne bindet (Abbildung 31), die zur Assoziation mit gp130

wichtig ist. Um zu untersuchen, ob diese Assoziation zu einem verminderten IL-6-vermittelten Signaling führt, wurde das Dimer2Side-Aptamer mit Hyper-IL-6 inkubiert und anschließend zu Zellen gegeben, die nur gp130 und nicht den IL-6R trugen. Im Anschluss wurde das IL-6-Signaling über einen immunologischen Nachweis von pSTAT3 untersucht (5.1.5.7). Als Kontrollen dienten Hyper-IL-6 ohne Aptamer und die nicht-bindende Variante Dimer2Side 2xG6T. Dem resultierenden Western-Blot war zu entnehmen, dass die jeweiligen Kontrukte zur Zellstimulation führten und dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Konstrukte zu sehen waren (Abbildung 73). Die Inkubation des Hyper-IL-6 mit dem Dimer2Side führte nicht zu einer verringerten biologischen Antwort. Ob das Dimer2Side tatsächlich zu einer Dimerisierung des Hyper-IL-6 führt, könnte über einen Gelshift-Assay untersucht werden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendete Hyper-IL-6-Menge insgesamt zu hoch war und der Unterschied in der biologischen Antwort durch den Überschuss an Hyper-IL-6 überdeckt wurde.

Das AIR-3A-Streptavidin-Konjugat setzte sich aus vier IL-6R-bindenden Aptameren zusammen, die prinzipiell alle ein Hyper-IL-6-Molekül binden können. Dieses Konstrukt könnte durch die erhöhte lokale Konzentration von Hyper-IL-6 zu einer verringerten biologischen Antwort führen. Darüber hinaus könnte das AIR-3A-Streptavidin-Konjugat dazu führen, dass durch sterische Hinderungen die Assoziation zum Signalüberträger gp130 nicht mehr gewährleistet ist. Dies würde ebenfalls zu einer verringerten Stimulation der Zellen führen. Dazu wurde das AIR-3A-Aptamer mit Hyper-IL-6 inkubiert und zu Zellen gegeben, die nur gp130 und nicht den IL-6R produzierten. Zur Untersuchung des IL-6-Signaling wurde pSTAT3 immunologisch in einem Western-Blot nachgewiesen. Das AIR-3A-Streptavidin-Konjugat führte nicht zu einer Verringerung des pSTAT3. Gegebenenfalls müsste auch hier eine geringere Menge Hyper-IL-6 eingesetzt werden, um Unterschiede im Signaling sehen zu können. Oder es müsste eine andere Nachweismethode gewählt werden. Beispielsweise könnten die durch pSTAT3 regulierten Gene detektiert werden, indem über eine quantitative RT-PCR die entsprechenden mRNAs nachgewiesen werden.

## 6.7 SPEZIFITÄT DER IL-6R-BINDENDEN APTAMERE

In der vorliegenden Arbeit wurden Aptamere beschrieben, die spezifisch an den IL-6R binden. Diese Aptamere AID-1, AIR-1 und AIR-3A haben die Gemeinsamkeit, dass sie G-Quadruplexe ausbilden. Dabei wurde über CD-spektroskopische Analysen für alle drei Aptamere eine parallel-angeordnete Quadruplex-Struktur ermittelt (Abbildung 14, Abbildung 28 und Abbildung 45). Die Spezifität der Aptamere wurde über Bindungstest mit Proteinen wie IL-6, Lysozym oder Trypsin bestätigt, da hier keine Bindung ersichtlich war [58].

Sequenzrecherchen ergaben, dass AID-1 die gleiche Sequenz wie ein bekannter HIV-1 Integrase Inhibitor hat. In einer Art post-selektivem Prozess wurden diverse Aptamervarianten auf die Bindung zur HIV-1 Integrase untersucht, um Varianten zu finden, die entweder an die HIV-1 Integrase oder an den IL-6R binden. Die Bindungstests ergaben, dass alle untersuchten Varianten ebenfalls an die Integrase bindeten. Die anschließende Analyse der Aptamere bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die 3'-Processing-Aktivität der HIV-1 Integrase zeigte, dass alle untersuchten Aptamer-Varianten das 3'-Processing inhibierten. Bei näherer Betrachtung der inhibitorischen Wirkung der einzelnen Aptamer-Varianten waren jedoch Unterschiede ersichtlich. Aptamer-Varianten, in denen eine Guanintransversion oder -transition vorgenommen wurde, zeigten einen verringerten inhibitorischen Effekt. Diese Varianten zeigten ebenfalls verringerte CD-Signale bei 265 nm, was auf einen destabilisierten Quadruplex schließen lässt. Für Varianten in denen Basen der Loopregionen ausgetauscht wurden, die nicht an der Quadruplex-Ausbildung beteiligt sind, wurden hingegen  $IC_{50}$ -Werte ermittelt, die im Bereich des Wildtyp-Aptamers liegen. Bei diesen Varianten wurden keine verringerten CD-Signale detektiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der inhibitorische Effekt auf das 3'-Processing der HIV-1 Integrase bei destabilisierten Quadruplexen geringer als bei stabileren Quadruplexen ist. Dieses Resultat geht konform mit Arbeiten, in denen Modifikationen des Inhibitors, die zu einer höheren Stabilität geführt haben, ebenfalls einen größeren inhibitorischen Effekt zeigten [115]. Seitens der HIV-1 Integrase war es nicht überraschend, dass die IL-6R-bindenden Aptamere ebenfalls HIV-1 Integrase Inhibitoren darstellen, da intrinsische Quadruplexe bekanntermaßen die HIV-1 Integrase inhibieren. Dazu gehört ebenfalls das Oligonucleotid mit der Sequenz  $(GGGGT)_4$  [116]. Das Quadruplex-bildende Oligonucleotid  $(GGGGT)_4$  inhibiert die HIV-1 Integrase, bindet jedoch nicht den IL-6R

[58]. Ein weiterer HIV-1 Integrase Inhibitor mit der Sequenz 5'-GTGGGTGGGTGGGTGGGT-3' (T30175) unterscheidet sich von AID-1 in einer zusätzlichen Base an Position 2. Bindungstests zeigten, dass dieser Inhibitor ebenfalls an den IL-6R bindete und zwar mit gleicher Affinität wie AID-1. Trotz des Thymidins an Position 2 muss sich eine Struktur ausbilden, die der AID-1 ähnlich ist. Denn im Gegensatz dazu konnte für die AID-1-Variante G1T keine Bindung zu IL-6R gezeigt werden. Diese Variante ähnelt T30175 in sofern, dass am 5'-Ende eine Guanin-Base fehlt: 5'-TGGTGGGTGGGTGGGT-3'. Es konnten keine Aptamer-Varianten identifiziert werden, die entweder spezifisch für den IL-6R oder für die HIV-1 Integrase sind. Aptamer-Varianten, die nicht an den IL-6R bindeten, wiesen ebenfalls geringere IC<sub>50</sub>-Werte auf.

Offen blieb die Frage, ob es dennoch einen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen IL-6R und HIV-1 Integrase gibt. Struktur-Vergleiche der beiden Proteine, die von Herrn Hansen angefertigt wurden, ergaben keine signifikanten Gemeinsamkeiten (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei diesen Struktur-Vergleichen wurden post-transkriptionelle Modifikationen wie Methylierungen oder Phosphorylierungen nicht berücksichtigt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auf den Proteinoberflächen ähnliche Strukturen vorliegen, die die verwendeten Programme zur Analyse nicht berücksichtigt haben.

Daher könnte es einen funktionellen Zusammenhang der beiden Proteine geben, da AID-1 bzw. T30923 sowie T30175 sowohl die HIV-Infektion als auch die HIV-1 Integrase inhibieren. Ferner wurde für T30175 HIV-gp120 als primäres Target identifiziert [117], so dass durch die T30175-Bindung die Interaktion des Virus mit der Zielzelle über CD-4-Rezeptoren blockiert wird. Die HIV-1 Integrase hingegen befindet sich im Inneren einer HIV-infizierten Zelle. Ein Zusammenhang wäre diesbezüglich zu klären.

## 7. AUSBLICK

Ein Ziel dieser Arbeit lag in der strukturellen Charakterisierung der Quadruplex-ausbildenden Aptamere und die Auswirkung von Einzelvariationen in Hinsicht auf die Struktur und die Bindung zum IL-6R. Es konnte bewiesen werden, dass die IL-6R-Bindung eng mit der Stabilität der Quadruplex-Struktur zusammenhängt. Einzelvariationen, die destabilisierend auf den Quadruplex wirkten, führten zum Verlust der IL-6R-Bindung. Auffällig war das (GGGT)<sub>3</sub>-Bindungsmotiv des DNA-Aptamers AID-1, das auch als HIV-Integrase-Aptamer bekannt ist und Ähnlichkeiten zum *c-Myc*-Promoter aufweist.

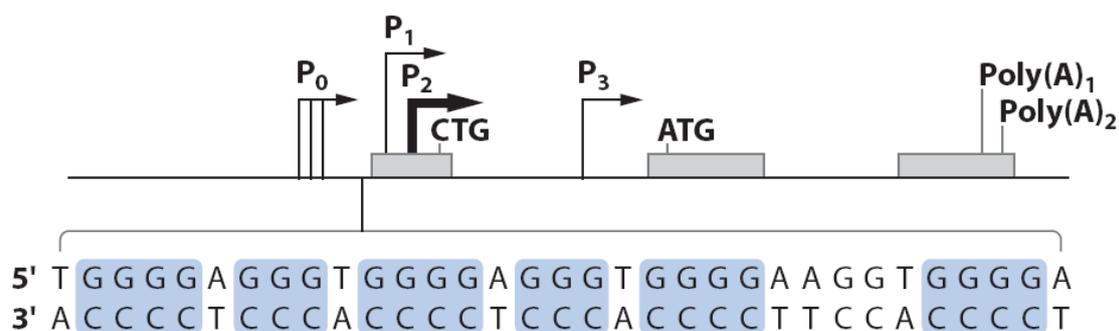
### 7.1 DAS IL-6R-BINDEnde DNA- BZW. HIV-INTEGRASE-APTAMER UND DER C-MYC-PROMOTER

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass das DNA-Aptamer AID-1 die gleiche Sequenz aufwies wie ein bekanntes Aptamer, das die HIV-Integrase bindet und inhibiert [60]. Das Aptamer bindet an beide Zielsubstanzen hoch affin.

Ein möglicher funktioneller Zusammenhang der HIV-1 Integrase und dem IL-6R wäre in weiteren Versuchen zu klären. Bekannt ist, dass Zellen, die vom HIV infiziert werden, den IL-6R auf der Zelloberfläche präsentieren. Zusätzlich bewirkt die Infektion durch HIV eine erhöhte Anzahl an IL-6R auf der Oberfläche der Wirtszelle bzw. eine erhöhte Konzentration an sIL-6R [30, 118]. Dies bedeutet, dass sowohl der IL-6R als auch die HIV-1 Integrase in bzw. an derselben Zelle lokalisiert sind. Diese Tatsache lässt einen möglichen Mechanismus postulieren, in dem AID-1 den IL-6R bindet und Rezeptor-vermittelt internalisiert wird und anschließend im Zytosol die HIV-1 Integrase bindet und inhibiert. Um diesen Mechanismus zu beweisen, müssten mehrere Teilschritte umgesetzt werden. Zunächst müsste die Rezeptor-vermittelte Internalisierung in IL-6R-tragenden Zellen bewiesen werden. Dazu müsste am besten eine interne Fluoreszenzmarkierung des Aptamers erfolgen, wie zum Beispiel mit Atto647. Um zu beweisen, dass AID-1 über den IL-6R die HIV-1 Integrase inhibiert, könnte zu HIV-infizierten Zellen AID-1 sowie AID-1-G6T gegeben werden. Da AID-1-G6T nicht an den IL-6R bindet, müsste im Vergleich zu AID-1 ein signifikanter Unterschied bezüglich des inhibitorischen Effektes zu sehen sein. Alternativ könnten HIV-infizierte Zellen

verwendet werden, die keinen IL-6R präsentieren. Der IL-6R könnte hierzu über siRNAs herabreguliert werden oder das entsprechende Gen wird direkt entfernt oder zerstört.

Sequenzvergleiche des Aptamer-Bindemotivs (GGGT)<sub>3</sub> zeigten, dass im *c-Myc*-Promoter eine ähnliche Sequenz zu finden ist (Abbildung 89). Der *c-Myc*-Promoter stellt einen wichtigen Regulator für zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung dar. Eine Dysregulation des Promoters steht oft im Zusammenhang mit Krebserkrankungen. Die Region innerhalb des *c-Myc*-Promoters, die dem DNA-Aptamer ähnelt, dient der Regulation des Promoters und wird als NHE III<sub>1</sub>-Region (Nuklease-hypersensitives Element) bezeichnet. NHE III<sub>1</sub> bildet eine Quadruplex-Struktur aus, die die Repression des Promoters fördert.



**Abbildung 91: Der *c-Myc*-Promoter [119].** Bei der Transkription über den *c-Myc*-Promoter sind mehrere Promotoren involviert (P<sub>0</sub>, P<sub>1-3</sub>). Insgesamt gibt es sieben NHEs im *c-Myc*-Promoter, jedoch nur NHE III<sub>1</sub> bildet eine Quadruplex-Struktur aus. Gezeigt ist die NHE III<sub>1</sub>-Sequenz, in der in blau die G- und C-reichen Bereiche hervorgehoben sind.

Es sind Transkriptionsfaktoren bekannt, die an die Quadruplex-Struktur des NHE III<sub>1</sub> binden und zur Aktivierung der Transkription dienen. Im Review von Gonzalez und Hurley sind die Transkriptionsfaktoren ausführlich beschrieben [119]. Darunter wird Nucleolin beschrieben, das G-Quadruplexe bindet und entwindet. Eine Entwindung der Quadruplex-Struktur könnte CD-spektroskopisch untersucht werden, indem die Nucleinsäure in An- und Abwesenheit des Nucleolins vermessen wird. Solche Quadruplex-entwindende Proteine könnten verwendet werden, um beispielsweise die Quadruplex-Struktur des RNA-Aptamers AIR-3A zu verifizieren, was bislang lediglich CD-spektroskopisch geschah.

Um außerdem eine Verbindung zwischen dem AID-1-Aptamer und NHE III<sub>1</sub> herzustellen, könnte geprüft werden, ob ein Oligonucleotid, bestehend aus dem Quadruplex-bildenden DNA-Abschnitt, an den IL-6R bindet. Inwiefern der IL-6R mit dem *c-Myc*-Promoter in Verbindung gesetzt werden kann, bleibt offen. Diverse Transkriptionsfaktoren binden spezifisch an Quadruplex-ausbildenden Nucleinsäuren. Vielleicht existiert eine Art Bindungsmotiv seitens der Proteine. Dazu könnten Sequenzvergleiche der Quadruplex-bindenden Proteine mit dem IL-6R durchgeführt werden.

## 7.2 DIE IL-6R-BINDENDEN APTAMERE ALS ZELLSPEZIFISCHE

### WIRKSTOFFÜBERTRÄGER

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, IL-6R-bindende Aptamere mit Substanzen wie Toxinen oder siRNAs zu konjugieren, um diese zellspezifisch in IL-6R-tragende Zellen zu bringen. Die Internalisierung der Aptamere konnte durch die direkte Fluoreszenzmarkierung des Aptamers und als fluoreszenzmarkiertes Aptamer-Streptavidin-Konjugat demonstriert werden. Die erfolgreiche Internalisierung eines Toxins oder einer siRNA konnte nicht gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Aptamer-siRNA-Chimäre konnte nicht mittels *in vitro* T7-Transkription hergestellt werden. Alternativ wären noch weitere Möglichkeiten denkbar, um das Aptamer mit siRNA zu konjugieren. Wie in Abbildung 6 dargestellt, könnte das Aptamer an einem Ende um den Sense-Strang verlängert werden und der anti-Sense-Strang daran hybridisiert werden. Die Verlängerung des Aptamers um die siRNA könnte außerdem über eine Hybridisierung stattfinden, indem Aptamer und siRNA um komplementäre Nucleinsäure-Abschnitte verlängert würden. Denkbar wäre auch Dimere über eine Hybridisierung zu bilden, indem ein Aptamer mit dem Sense-Strang und ein anderes Aptamer mit dem anti-Sense-Strang verlängert würden.

Die Internalisierung der Aptamer-Streptavidin-Konjugate eröffnet eine Vielzahl von Möglichkeiten, indem das Fluorophor gegen andere biotinylierte Substanzen ausgetauscht werden würde. Das Konjugat könnte auch aus einer Kombination verschiedener Substanzen zusammengesetzt sein, so dass das IL-6R-Aptamer die Internalisierung ermöglichte, ein zweites Aptamer im Zytosol spezifische Komponenten bände und ein Fluorophor die Detektion ermöglichte. Außerdem wäre auch die

Konjugation mit Toxinen denkbar, die über eine reversible Thiolbindung im Innern der Zelle abgespalten werden könnte.

## 8. LITERATUR

- [1] Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology* 2006;195 (4):173-83.
- [2] Xu GY, Yu HA, Hong J, Stahl M, McDonagh T, Kay LE, Cumming DA. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol* 1997;268 (2):468-81.
- [3] Snyers L, Fontaine V, Content J. Modulation of interleukin-6 receptors in human cells. *Ann N Y Acad Sci* 1989;557:388-93; discussion 94-5.
- [4] Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998;128 (2):127-37.
- [5] Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 ( Pt 2):297-314.
- [6] Hammacher A, Richardson RT, Layton JE, Smith DK, Angus LJ, Hilton DJ, Nicola NA, Wijdenes J, Simpson RJ. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998;273 (35):22701-7.
- [7] Horsten U, Schmitz-Van de Leur H, Mullberg J, Heinrich PC, Rose-John S. The membrane distal half of gp130 is responsible for the formation of a ternary complex with IL-6 and the IL-6 receptor. *FEBS Lett* 1995;360 (1):43-6.
- [8] Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003;300 (5628):2101-4.
- [9] Grotzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M, Rose-John S. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins* 1997;27 (1):96-109.
- [10] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374 (Pt 1):1-20.
- [11] Zohlhofer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E, Heinrich PC. The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS letters* 1992;306 (2-3):219-22.
- [12] Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Mullberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC, Graeve L. 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. *The Journal of biological chemistry* 1994;269 (29):19014-20.
- [13] Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989;74 (5):1704-10.
- [14] Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4 (2):96-100.
- [15] Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Heinrich PC, Rose-John S. Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 1992;189 (2):794-800.
- [16] Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology* 1993;23 (2):473-80.

- [17] Mullberg J, Oberthur W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1994;152 (10):4958-68.
- [18] Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 2003;278 (40):38829-39.
- [19] Chalaris A, Gewiese J, Paliga K, Fleig L, Schneede A, Krieger K, Rose-John S, Scheller J. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta*;1803 (2):234-45.
- [20] Walev I, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S, Rose-John S. Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93 (15):7882-7.
- [21] Vollmer P, Walev I, Rose-John S, Bhakdi S. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infection and immunity* 1996;64 (9):3646-51.
- [22] Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 2001;15 (1):43-58.
- [23] Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science (New York, N Y )* 1992;257 (5066):88-91.
- [24] Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 1996;11 (1):88-95.
- [25] Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, et al. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 1989;143 (12):3949-55.
- [26] Brandt SJ, Bodine DM, Dunbar CE, Nienhuis AW. Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *The Journal of clinical investigation* 1990;86 (2):592-9.
- [27] Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89 (1):232-5.
- [28] Stubner S, Schon T, Padberg F, Teipel SJ, Schwarz MJ, Haslinger A, Buch K, Dukoff R, Lasser R, Muller N, Sunderland T, Rapoport SI, Moller HJ, Hampel H. Interleukin-6 and the soluble IL-6 receptor are decreased in cerebrospinal fluid of geriatric patients with major depression: no alteration of soluble gp130. *Neurosci Lett* 1999;259 (3):145-8.
- [29] Jablonska E. Changes in sIL-6R and sTNF-Rs release by PMNs and the serum levels in breast cancer patients at different stages of treatment. *Cytokine* 1998;10 (7):540-3.

- [30] Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1992;148 (7):2175-80.
- [31] Strassmann G, Jacob CO, Evans R, Beall D, Fong M. Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1992;148 (11):3674-8.
- [32] Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 1997;15 (2):142-5.
- [33] Ozbek S, Peters M, Breuhahn K, Mann A, Blessing M, Fischer M, Schirmacher P, Mackiewicz A, Rose-John S. The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* 2001;20 (8):972-9.
- [34] Klug SJ, Famulok M. All you wanted to know about SELEX. *Mol Biol Rep* 1994;20 (2):97-107.
- [35] Holeman LA, Robinson SL, Szostak JW, Wilson C. Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold Des* 1998;3 (6):423-31.
- [36] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990;249 (4968):505-10.
- [37] Tang Z, Parekh P, Turner P, Moyer RW, Tan W. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin Chem* 2009;55 (4):813-22.
- [38] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem* 2001;276 (19):16464-8.
- [39] Lorger M, Engstler M, Homann M, Goring HU. Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. *Eukaryot Cell* 2003;2 (1):84-94.
- [40] Yamazaki S, Tan L, Mayer G, Hartig JS, Song JN, Reuter S, Restle T, Laufer SD, Grohmann D, Krausslich HG, Bajorath J, Famulok M. Aptamer displacement identifies alternative small-molecule target sites that escape viral resistance. *Chem Biol* 2007;14 (7):804-12.
- [41] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391 (6669):806-11.
- [42] Zhou J, Rossi JJ. Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence*;1 (1):4.
- [43] Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, Meyerholz DK, McCaffrey AP, McNamara JO, 2nd, Giangrande PH. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol* 2009;27 (9):839-49.
- [44] McNamara JO, 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 2006;24 (8):1005-15.
- [45] Guo S, Tschammer N, Mohammed S, Guo P. Specific delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA. *Hum Gene Ther* 2005;16 (9):1097-109.
- [46] Chu TC, Twu KY, Ellington AD, Levy M. Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 2006;34 (10):e73.

- [47] Chu TC, Marks JW, 3rd, Lavery LA, Faulkner S, Rosenblum MG, Ellington AD, Levy M. Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res* 2006;66 (12):5989-92.
- [48] Bagalkot V, Farokhzad OC, Langer R, Jon S. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45 (48):8149-52.
- [49] Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, Chen Y, Tan W. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem* 2009;10 (5):862-8.
- [50] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, Lavan DA, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64 (21):7668-72.
- [51] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103 (16):6315-20.
- [52] Cao Z, Tong R, Mishra A, Xu W, Wong GC, Cheng J, Lu Y. Reversible cell-specific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48 (35):6494-8.
- [53] Tong GJ, Hsiao SC, Carrico ZM, Francis MB. Viral capsid DNA aptamer conjugates as multivalent cell-targeting vehicles. *J Am Chem Soc* 2009;131 (31):11174-8.
- [54] Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest* 2000;106 (8):923-8.
- [55] Chen CH, Dellamaggiore KR, Ouellette CP, Sedano CD, Lizadjohry M, Chernis GA, Gonzales M, Baltasar FE, Fan AL, Myerowitz R, Neufeld EF. Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105 (41):15908-13.
- [56] Zhou J, Rossi JJ. Cell-Specific Aptamer-Mediated Targeted Drug Delivery. *Oligonucleotides*.
- [57] Meyer C. Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamere. Institut für Biochemie und Molekularbiologie: Universität Hamburg, 2009.
- [58] Zivkovic T. Interleukin-6-Rezeptor-spezifische DNA-Aptamere. Institut für Biochemie und Molekularbiologie: Universität Hamburg, 2010.
- [59] Li M-H, Zhou Y-H, Luo Q, Li Z-S. The 3D structures of G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors: molecular dynamics simulations in aqueous solution and in the gas phase. *Journal of molecular modeling*;16 (4):645-57.
- [60] Mazumder A, Neamati N, Ojwang JO, Sunder S, Rando RF, Pommier Y. Inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 integrase by guanosine quartet structures. *Biochemistry* 1996;35 (43):13762-71.
- [61] Ojwang JO, Buckheit RW, Pommier Y, Mazumder A, De Vreese K, Este JA, Reymen D, Pallansch LA, Lackman-Smith C, Wallace TL, et al. T30177, an oligonucleotide stabilized by an intramolecular guanosine octet, is a potent inhibitor of laboratory strains and clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39 (11):2426-35.
- [62] Ojwang J, Elbaggari A, Marshall HB, Jayaraman K, McGrath MS, Rando RF. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro by oligonucleotides composed entirely of guanosine and thymidine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7 (6):560-70.
- [63] Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:2013-8.

- [64] Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21 (4):136-42.
- [65] Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* 1989;59 (5):871-80.
- [66] Bates P, Mergny JL, Yang D. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *EMBO Rep* 2007;8 (11):1003-10.
- [67] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985;43 (2 Pt 1):405-13.
- [68] Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987;51 (6):887-98.
- [69] Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989;337 (6205):331-7.
- [70] Blackburn EH. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu Rev Biochem* 1984;53:163-94.
- [71] Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85 (18):6622-6.
- [72] Wang Y, Patel DJ. Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry* 1992;31 (35):8112-9.
- [73] Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008;10 (2):228-36.
- [74] Giraldo R, Suzuki M, Chapman L, Rhodes D. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91 (16):7658-62.
- [75] Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Res* 1998;26 (5):1167-72.
- [76] Sun H, Bennett RJ, Maizels N. The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res* 1999;27 (9):1978-84.
- [77] Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol* 2007;3 (4):218-21.
- [78] Arora A, Dutkiewicz M, Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Kurreck J. Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA* 2008;14 (7):1290-6.
- [79] Lu M, Guo Q, Kallenbach NR. Structure and stability of sodium and potassium complexes of dT4G4 and dT4G4T. *Biochemistry* 1992;31 (9):2455-9.
- [80] Balagurumoorthy P, Brahmachari SK, Mohanty D, Bansal M, Sasisekharan V. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences. *Nucleic Acids Res* 1992;20 (15):4061-7.
- [81] Lu M, Guo Q, Kallenbach NR. Thermodynamics of G-tetraplex formation by telomeric DNAs. *Biochemistry* 1993;32 (2):598-601.
- [82] Kypr J, Kejnovska I, Rencuk D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res* 2009;37 (6):1713-25.
- [83] Ploen D. Strukturelle Untersuchungen viraler RNA-Pseudoknoten. Institut für Biochemie und Molekularbiologie: Universität Hamburg, 2008.

- [84] Snyers L. 1988.
- [85] Taga T, Kawanishi Y, Hardy RR, Hirano T, Kishimoto T. Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *J Exp Med* 1987;166 (4):967-81.
- [86] Hall KB, Kranz JK. Nitrocellulose filter binding for determination of dissociation constants. *Methods Mol Biol* 1999;118:105-14.
- [87] de Soultrait VR, Lozach PY, Altmeyer R, Tarrago-Litvak L, Litvak S, Andreola ML. DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents. *J Mol Biol* 2002;324 (2):195-203.
- [88] Debysers Z, Cherepanov P, Pluymers W, De Clercq E. Assays for the evaluation of HIV-1 integrase inhibitors. *Methods Mol Biol* 2001;160:139-55.
- [89] Jing N, Hogan ME. Structure-activity of tetrad-forming oligonucleotides as a potent anti-HIV therapeutic drug. *J Biol Chem* 1998;273 (52):34992-9.
- [90] Kankia BI, Marky LA. Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr(2+): stability, heat, and hydration. *J Am Chem Soc* 2001;123 (44):10799-804.
- [91] Hansen B. Aptamer-Protein-Interaktionen: Simulation und Modellierung. Zentrum für Bioinformatik. Hamburg: Universität Hamburg, 2011.
- [92] Walsh R, DeRosa MC. Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388 (4):732-5.
- [93] Lauhon CT, Szostak JW. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J Am Chem Soc* 1995;117 (4):1246-57.
- [94] Joachimi A, Benz A, Hartig JS. A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities. *Bioorg Med Chem* 2009;17 (19):6811-5.
- [95] McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, Sullenger B, Gilboa E. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest* 2008;118 (1):376-86.
- [96] Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, Lee J, Layzer JM, Gilboa E, Sullenger BA. Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem Biol* 2008;15 (7):675-82.
- [97] Eydeler K. Charakterisierung von RNA-Aptameren mit Spezifität für den humanen Interleukin-6-Rezeptor Institut für Biochemie und Molekularbiologie. Hamburg: Universität Hamburg, 2011.
- [98] Li MH, Zhou YH, Luo Q, Li ZS. The 3D structures of G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors: molecular dynamics simulations in aqueous solution and in the gas phase. *J Mol Model* 2010;16 (4):645-57.
- [99] Grotzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, Rose-John S. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem* 1999;380 (7-8):803-13.
- [100] Stirpe F, Olsnes S, Pihl A. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J Biol Chem* 1980;255 (14):6947-53.
- [101] Lyu MA, Sung B, Cheung LH, Marks JW, Aggarwal BB, Aguiar RC, Rosenblum MG. The rGel/BlyS fusion toxin inhibits STAT3 signaling via down-regulation of interleukin-6 receptor in diffuse large B-cell lymphoma. *Biochem Pharmacol*;80 (9):1335-42.
- [102] Thorpe PE, Brown AN, Ross WC, Cumber AJ, Detre SI, Edwards DC, Davies AJ, Stirpe F. Cytotoxicity acquired by conjugation of an anti-Thy1.1 monoclonal antibody and the ribosome-inactivating protein, gelonin. *Eur J Biochem* 1981;116 (3):447-54.
- [103] Li HG, Huang PL, Zhang D, Sun Y, Chen HC, Zhang J, Kong XP, Lee-Huang S. A new activity of anti-HIV and anti-tumor protein GAP31: DNA adenosine glycosidase--

- structural and modeling insight into its functions. *Biochem Biophys Res Commun*;391 (1):340-5.
- [104] Sean Kelley S, KarinMusier-Forsyth, BesikI.Kankia. HIV-integraseptamerfoldsintoaparallelquadruplex:Athermodynamic study. *Biophysical Chemistry* 2011;100 (3):234.
- [105] Caceres C, Wright G, Gouyette C, Parkinson G, Subirana JA. A thymine tetrad in d(TGGGGT) quadruplexes stabilized with Tl<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ions. *Nucleic Acids Res* 2004;32 (3):1097-102.
- [106] Patel PK, Hosur RV. NMR observation of T-tetrads in a parallel stranded DNA quadruplex formed by *Saccharomyces cerevisiae* telomere repeats. *Nucleic Acids Res* 1999;27 (12):2457-64.
- [107] Santulli-Marotto S, Nair SK, Rusconi C, Sullenger B, Gilboa E. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res* 2003;63 (21):7483-9.
- [108] Hasegawa H. Synchrony and variability induced by spatially correlated additive and multiplicative noise in the coupled Langevin model. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2008;78 (3 Pt 1):031110.
- [109] Voet JG, Voet D. *Biochemistry and Molecular Biology Education (BAMBE)*. *Biochem Educ* 2000;28 (3):124.
- [110] Thiel S, Dahmen H, Martens A, Muller-Newen G, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett* 1998;441 (2):231-4.
- [111] Thiel S, Behrmann I, Dittrich E, Muys L, Tavernier J, Wijdenes J, Heinrich PC, Graeve L. Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;330 ( Pt 1):47-54.
- [112] Jean LF, Murphy JR. Diphtheria toxin receptor-binding domain substitution with interleukin 6: genetic construction and interleukin 6 receptor-specific action of a diphtheria toxin-related interleukin 6 fusion protein. *Protein Eng* 1991;4 (8):989-94.
- [113] Harborth J, Elbashir SM, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense & nucleic acid drug development* 2003;13 (2):83-105.
- [114] Chiu Y-L, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular cell* 2002;10 (3):549-61.
- [115] Jing N, De Clercq E, Rando RF, Pallansch L, Lackman-Smith C, Lee S, Hogan ME. Stability-activity relationships of a family of G-tetrad forming oligonucleotides as potent HIV inhibitors. A basis for anti-HIV drug design. *J Biol Chem* 2000;275 (5):3421-30.
- [116] Jing N, Marchand C, Liu J, Mitra R, Hogan ME, Pommier Y. Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in Vitro. *J Biol Chem* 2000;275 (28):21460-7.
- [117] Este JA, Cabrera C, Schols D, Cherepanov P, Gutierrez A, Witvrouw M, Pannecouque C, Debyser Z, Rando RF, Clotet B, Desmyter J, De Clercq E. Human immunodeficiency virus glycoprotein gp120 as the primary target for the antiviral action of AR177 (Zintevir). *Mol Pharmacol* 1998;53 (2):340-5.
- [118] Novick D, Shulman LM, Chen L, Revel M. Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine* 1992;4 (1):6-11.

- [119] Gonzalez V, Hurley LH. The c-MYC NHE III(1): function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;50:111-29.

## 9. ANHANG

### 9.1 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		

## 9.2 SICHERHEITSHINWEISE FÜR GEFÄHRSTOFFE

### 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:	<b>Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.</b>
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.

---

## 9.3 GEFÄHRSTOFFINFORMATIONEN

Tabelle 37: 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	
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

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
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

## 9.4 AUFLISTUNG VERWENDETER KMR-SUBSTANZEN, KAT. I &amp; II

Tabelle 38: 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 ( <sup>32</sup> P) zur radioaktiven Markierung von Nucleinsäuren Menge: 100 µL	
72-57-1	Cycloheximid	wässrige Lösung in der Zellkultur (1 mg/mL) Menge: 30 µL	M2, R <sub>E</sub> 1B
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/mL wässrige Lösungen zur Färbung von Polyacrylamidgelen (0,5 mg/mL Endkonzentration): 150 µL	M2
68-12-2	<i>N, N</i> -Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von Western Blots 1,5 mL	RE1B

## 11. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uli Hahn für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas und sein Vertrauen.

Den beiden Herren Dr. Patrick Ziegel Müller und Dr. Nicolas Piganeau danke ich für immerwährenden guten Rat und Hilfestellungen bei sowohl fachlichen als auch reisetechischen Fragen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Cindy Meyer bedanken, die einen super Job als Post-Doc geleistet hat und mich immer fachlich und moralisch unterstützt hat. Denn am Ende wird alles gut.

Katja Eydeler danke ich für die erfolgreiche und unkomplizierte Zusammenarbeit und dass wir trotz einiger Widrigkeiten unser Ziel erreicht haben.

Frau Dr. Christina Stacke möchte ich für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und sehr nette Laborzeit danken.

Außerdem möchte ich besonders bei Anna Rath für ihre gute Laune, Sven Kruspe für seine musikalische Untermalung im Labor, Volker Lenski für seine ständige Hilfsbereitschaft und Katrin Seelhorst für die netten Kaffeepläuschen bedanken.

Bei Jan-Hinnerk Jarck möchte ich mich für die Einführung in die SPR-Spektroskopie bedanken und für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen.

Für hervorragende technische Assistenz und Zusammenarbeit möchte ich neben Elena Wasiljew, Frauke Fuchs und Alina Wimmer danken.

Vom Herzen danke ich Moritz Waldmann, dass er mich immerzu bestärkt hat, weiter zu machen und mich immer wieder zurück ins Labor geschickt hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für Ihre ständige Unterstützung bedanken, auch wenn ich nicht Nuclearbiologie studiert habe.

## **12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

Hamburg, September 2011

Eileen Magbanua

## 13. LEBENSLAUF

**Eileen Magbanua**

Eileen.Magbanua@hotmail.com

12. Mai 1981 in Hamburg

deutsch

---

### Ausbildung und erste Berufserfahrungen

- 12/2007 – 12/2011 **Promotion**  
 Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg  
*Thema:*  
 Charakterisierung von Interleukin-6-Rezeptor-spezifischen Aptameren
- Aptamer-vermittelte Internalisierung
  - Crosslinking von Aptameren zur zellspezifischen Wirkstoffübertragung von Toxinen, fluoreszierenden Proteinen und siRNAs
  - G-Quadruplex-Strukturen
- wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
 Betreuung des Praktikums Biochemie/Molekularbiologie, Planung und Anleitung von Diplom- und Bachelorarbeiten und Auszubildenden
- 10/2007 **Diplom-Biologin**  
 Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg  
*Thema:*  
 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von verschiedenen RNA-Fusions-Konstrukten
- Interaktionsanalyse von Fluorophoren und mRNA mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
- 09/2002 – 10/2007 **Studium der Biologie** an der Universität Hamburg  
 Schwerpunkte: Biochemie und Genetik/Molekularbiologie
- 09/2003 – 9/2007 **Werksstudentin**  
 tesa AG, Hamburg  
 Abteilung BU Masking/Automotive, Labor Protection + Design
- Unterstützung bei praktischen Labortätigkeiten im Rahmen der Produktentwicklung und Sortimentspflege
- 8/2000 - 6/2002 **Biologisch-technische Assistentin**  
 Gewerbeschule 13, Hamburg  
 Schwerpunkt: Biochemie
- 8/1993 - 7/2000 **Abitur / Allgemeine Hochschulreife**  
 Emilie Wüstenfeld Gymnasium, Hamburg

---

### **Besondere Kenntnisse**

Zellbiologie	Zellkultur (Säuger- und Insektenzellen), Toxizitäts- und Proliferationstests, Durchflusszytometrie, konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie, RNA-Interferenz
Proteinbiochemie	rekombinante Expression und Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i> und Insektenzellen (Bac-to-Bac) über Affinitätschromatographie (Äkta), SDS-PAGE, Western-Blot
Molekularbiologie	PCR, DNA-Klonierung, Northern- und Southern-Blot-Analyse, Crosslinking von RNA mit Proteinen, Arbeiten mit <sup>32</sup> P
Analyse	Äkta, FCS, FCCS, SPR, CD-Spektroskopie
Computer	MS Office, Endnote, GraphPad, QuantityOne, Vector NTI, ISIS Draw
Sprachen	Deutsch: Muttersprache Englisch: gut in Wort und Schrift Französisch: Grundkenntnisse Tagalog: Grundkenntnisse

---

### **Publikationen**

Eydeler, K., **Magbanua, E.**, Werner, A., Ziegelmüller, P. and Hahn, U. (2009) Fluorophore binding aptamers as a tool for RNA visualization. *Biophys J*, 96, 3703-3707.

**Magbanua, E.**, Eydeler, K., Lenksi, V., Werner, A. and Hahn, U. Studying aptamer/ligand interactions using fluorescence correlation spectroscopy, in *Methods for Studying Nucleic Acid Drug Interactions*, Yitzhak, T., Wanunu, M. CRC Press, 2011. (accepted)

Meyer, C., Eydeler, K., **Magbanua, E.**, Zivkovic, T., Piganeau, N., Lorenzen, I., Grötzinger, J., Mayer, G., Rose-John, S. and Hahn, U. (2011) IL-6 receptor RNA aptamers for specific cargo delivery into target cells. *RNA Biology*. (in press)



Hamburg, Dezember 2011

Eileen Magbanua