

Selektion, Charakterisierung und postselektive
Modifikation eines Interleukin-6-Rezeptor Domäne 3
spezifischen RNA-Aptamers

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Vorgelegt von M. Sc.

Florian Mittelberger

Hamburg, 2015

Die vorgelegte Arbeit wurde von April 2011 bis Oktober 2015 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn

Herr Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 17. Dezember 2015

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 1) Mittelberger, F. *et al.* RAID3 - An interleukin-6 receptor-binding aptamer with post-selective modification-resistant affinity. *RNA Biol* **12**, 1043–53 (2015).
- 2) Kruspe, S., Mittelberger, F., Szameit, K. & Hahn, U. Aptamers as drug delivery vehicles. *ChemMedChem* **9**, 1998 - 2011 (2014).

Für all diejenigen, die mich unterstützt haben; direkt oder indirekt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abstract.....	XIV
Zusammenfassung.....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Interleukin-6 – ein vielseitiges Zytokin.....	1
1.2 Interleukin-6 – Struktur und Signaltransduktion.....	2
1.3 IL-6 in der Pathogenese.....	8
1.4 Strategien zur Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion.....	10
1.5 Aptamere.....	13
1.6 Aptamer-Selektion.....	14
1.7 Aptamer-Modifikationen.....	20
1.8 Medizinische Anwendungen für Aptamere.....	21
1.9 Aptamer - vermittelte Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion.....	24
2 Zielsetzung.....	25
3 Material.....	26
3.1 Chemikalien.....	26
3.2 Puffer, Medien und Lösungen.....	27
3.2.1 Puffer und Lösungen zu Analyse von Nucleinsäuren.....	27
3.2.2 Puffer und Lösungen zu Selektion von Aptameren.....	27
3.2.3 Puffer und Lösungen zu Analyse von Proteinen.....	28
3.2.4 Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten.....	29
3.3 Nucleinsäure- und Proteinstandards.....	29

3.4	Kits	29
3.5	Nukleotide und Radionukleotide.....	30
3.6	Allgemeine Materialien zur Aptamer-Selektion.....	30
3.7	Nukleinsäuremoleküle.....	30
3.7.1	Vektor	30
3.7.2	DNA-Oligonukleotide:	31
3.7.3	RNA-Oligonukleotide:.....	32
3.8	Verwendete Proteine	32
3.8.1	Verwendete Enzyme	32
3.8.2	Weitere verwendete Proteine	33
3.9	Bakterienstamm	33
3.10	Zelllinien.....	33
3.11	Verwendete Instrumente.....	34
3.12	weitere Materialien	34
3.13	verwendete Software	35
4	Methoden.....	36
4.1	Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	36
4.1.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
4.1.2	Proteintrennung und -analyse durch P200 <i>ScreenTape</i>	37
4.1.3	Proteinnachweis mittels Silberfärbung.....	37
4.1.4	Proteinnachweis mittels CoomassieBrilliant Blue.....	37
4.1.5	Biotinylierung von Proteinen	37
4.1.6	Dialyse von Biotinylierungsansätzen.....	38
4.1.7	DotBlot zum Nachweis biotinylierter Proteine	38

4.1.8	Kopplung von biotinylierter IL-6R D3 an Dynabeads® M-280 Streptavidin	38
4.2	Analyse und Reinigung von Nukleinsäuren	39
4.2.1	Native PAGE für dsDNA-Fragmente	39
4.2.2	Agarosegelelektrophorese	39
4.2.3	Denaturierende PAGE	40
4.2.4	Nukleinsäurenachweis mittels Ethidiumbromid	40
4.2.5	Nukleinsäurenachweis mittels UV-Shadowing	40
4.2.6	Nukleinsäurenachweis mittels Autoradiographie.....	41
4.2.7	Nachweis fluoreszenzmarkierter RNA.....	41
4.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
4.2.9	Diffusionselution zur Rückgewinnung von Nukleinsäuren aus PAA-Gelen	42
4.2.10	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren.....	42
4.2.11	Isolation von DNA aus Agarosen-Gelen	43
4.3	<i>In vitro</i> Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren	43
4.3.1	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
4.3.2	Kolonie-PCR.....	44
4.3.3	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	44
4.3.4	Klenow-Fragment-abhängige Primerextension	45
4.3.5	<i>In vitro</i> T7-Transkription.....	46
4.3.6	<i>In vitro</i> T7-Transkription unter Verwendung von 2'-F-Pyrimidinen.....	47
4.3.7	Radioaktive Markierung des 5'-Terminus von RNA-Molekülen.....	48
4.4	<i>In vitro</i> -Selektion von RNA-Aptameren für die Domäne 3 des Interleukin-6-Rezeptors	49
4.5	Klonierung der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek.....	50
4.5.1	XcmI-Restriktion des Vektors pUC19-T	50

4.5.2	Ligation des linearisierten pUC19-T und der angereicherten R1 Nukleinsäure-Bibliothek.....	51
4.5.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
4.5.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	52
4.5.5	Isolation von Plasmid-DNA aus monoklonalen <i>E. coli</i> -Kolonien	53
4.5.6	DNA-Sequenzierung der klonierten Nukleinsäure-Bibliothek	53
4.5.7	Bioinformatische Auswertung von DNA-Sequenzierungen	53
4.6	Identifikation und Charakterisierung von Aptameren	53
4.6.1	Filterretentionsassay (FRA)	53
4.6.2	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	54
4.6.3	<i>Microscale</i> Thermophorese	55
4.6.4	Charakterisierung der Stabilität modifizierter und nicht-modifizierter RNA-Moleküle	55
4.6.5	Bestimmung des Circular dichroismus von RNA-Molekülen	56
4.7	Zellbiologische Arbeiten	56
4.7.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	56
4.8	Charakterisierung der Aptamer-Bindung an Zellen.....	57
4.8.1	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	57
4.8.2	Durchflusszytometrie	58
4.9	Berechnung der Oberflächenladung des IL-6R.....	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Selektion von IL-6R-Domäne-3-spezifischen RNA-Aptameren	60
5.1.1	Biotinylierung von IL-6R Domäne 3.....	60
5.1.2	Selektion von IL-6R D3 spezifischen RNA Aptameren.....	62

5.1.3	Analyse der Affinität der angereicherten RNA-Bibliothek für die IL-6R D3 und den sIL-6R.	65
5.1.4	Klonierung und Sequenzierung der für die IL-6R D3 angereicherten Bibliothek.....	68
5.2	Charakterisierung der identifizierten Aptamer-Kandidaten	70
5.2.1	Überprüfung der verwendeten Proteine	70
5.2.2	FRA-Analyse der Sequenzfamilien 1-5	71
5.2.3	Charakterisierung der Spezifität der sIL-6R bindenden Aptamerfamilien F2 und F4	73
5.3	Verkürzung und strukturelle Charakterisierung des IL-6R D3-spezifischen Aptamers F4	77
5.3.1	Minimierung von F4 anhand von Sekundärstrukturvorhersagen.....	77
5.3.2	Charakterisierung der verkürzten F4-Varianten	82
5.3.3	Bioinformatische Evaluation möglicher G-Quadruplexe in RAID3.....	84
5.3.4	Untersuchung des Circular dichroismus von RAID3.....	88
5.3.5	SAXS-Messungen und Erstellung eines molekularen Modells von RAID3	89
5.4	Charakterisierung der RAID3-Bindung an IL-6R präsentierende BaF3-Zellen.....	90
5.4.1	Mikroskopische Untersuchung der RAID3-Bindung an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen	91
5.4.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der RAID3-Bindung an BaF3/gp130/IL- 6R/TNF-Zellen.....	95
5.5	Postselektive Modifikation von RAID3	99
5.5.1	2'-F Modifikation von F4 SL, SKL und RAID3	99
5.5.2	Stabilität von RAID3 und RAID3 2'-F in DMEM	101
6	Diskussion.....	103
6.1	Selektion und Charakterisierung von IL-6R D3 spezifischen RNA-Aptameren.....	103

6.2	Aptamer-vermittelte Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion	107
6.3	Verkürzung und strukturelle Untersuchung von F4	110
6.4	Charakterisierung der Bindung von RAID3 an IL-6R-präsentierende BaF3-Zellen	115
6.5	Postselektive Modifikation von RAID3	117
7	Ausblick	121
7.1	Aptamer vermittelte Blockierung des IL-6R/sIL-6R	121
7.2	Charakterisierung der Struktur von RAID3	123
8	Literatur	128
9	Danksagung	144
10	Anhang	145
10.1	GHS-Gefahrstoffverordnung	145
10.2	H-Sätze	147
10.3	P-Sätze	149
10.4	Gefahrenstoffinformationen	151
10.5	Liste der verwendeten KMR-Stoffe, Kat. 1 & 2	153
10.6	Weitere Nukleinsäuren	154
11	Eidesstattliche Erklärung	156

Abkürzungsverzeichnis

2'-F-Py	2'-Desoxy-2'fluoropyrimidin
2'-O-Me-Pu	2'-Desoxy-2'-methoxypurin
3'-3'-dT	3'-3'-verknüpftes Deoxythymidin
A	Adenin
ADAM 17	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BaF3	<i>Bone marrow-derived pro-B-cell line</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bn	5-Benzyl
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CBM	Zytokin-Bindemodul (<i>cytokine binding module</i>)
CCL	Cystein-Cystein-Ligand (Chemokinfamilie)
CD	Cirkulardichroismus-Spektroskopie
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CIS	<i>Cytokine-inducible-SH2-protein</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CNTF	<i>Ciliary inhibition factor</i>
CT-1	<i>Cardiotropin-1</i>
CTP	Cytosintriphosphat
CXCL	Cystein-beliebige AS-Cystein-Ligand (Chemokinfamilie)

D	Domäne (in Bezug auf Proteine)
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
F	Familie
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FERM	4.1/Ezrin/Radixin/Moesin
FFS	Freifluss-Elektrophorese
FIMDA	<i>Fluorescence intensity multiple distribution analysis</i>
FKS	Fötale Kälberserum
FNIII	Fibronektin-III
FRA	Filterretentionsassay
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward-scatter</i>)
Fw	<i>Forward</i>
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
gp130	Glykoprotein 130
G-Phase	<i>Growth phase</i>
GQ	G-Quadruplex
Grb2/SOS	<i>growth-factor-bound-protein/son of sevenless</i>
GTP	Guanosintriphosphat

hIL-6R	humaner Interleukin-6-Rezeptor
HFT	Hauptfarbteiler
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
Jak	Janus-Kinase
K	Klon
KIR	Kinase-Inhibitor-Region
kLSM	Konfokales <i>laser scanning</i> Mikroskop
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LD	<i>Loading dye</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	LIF-Rezeptor
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LP	Langpassfilter
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
miRNA	Mikro-RNA
mIL-6R	Membrangebundener IL-6R
MMS	Mikromagnetische Separation
Mod	Modifiziert
M-Phase	Mitotische Phase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NFT	Nebenfarbteiler
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NMIA	<i>N-Methylisatin-säureanhydrid</i>

NNT-1	<i>Cardiotrophin-like related cytokine and stimulating neurotrophin-1/B-cell stimulation factor 3</i>
NPN	Neuropoietin
nt	Nukleotide
NTPs	Nukleosid-5'-triphosphate
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
OSM	<i>Oncostatin M</i>
OSMR	OSM-Rezeptor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K-PkB/Akt	<i>Phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt</i>
PIAS	<i>Inhibitor of activated STAT</i>
PLK1	<i>Polo like kinase 1</i>
PMT	<i>Photo multiplier tube</i>
PNK	Polynukleotidkinase
PSM'	Splice-Form von PSMA
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
R	Purin (A oder G; im Kontext einer Nukleotidsequenz)
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RAID3	RNA-Aptamer für IL-6R D3
RAID3s	RAID3 <i>short</i>
RBS	Ribosomen-Bindestelle
Rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sel.	Selektionszyklus
SELEX	Systematische Evolution von Ligandendurch exponentielle Anreicherung (<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
sgp130Fc	Fusionsprotein des löslichen gp130 und des Fc-teils eines IgG1 AK
SH2	Src-Homologie 2
SHAPE	<i>Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension</i>
SHP2	<i>SH2 containing tyrosine phosphatase</i>
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
SK	Stamm kurz
SKL	Stamm kurz <i>leader</i>
SL	Stamm <i>leader</i>
SOC	<i>Salt-optimized + carbon</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SOMAmer	<i>Slow off-rate modified Aptamer</i>
Src	auch c-Src, <i>cellular + sarcoma</i>
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>sideways-scatter</i>)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
ssRNA	Einzelsträngige RNA (<i>single stranded RNA</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STK	Signaltransduktionskomplex
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotin-amido) hexanoat
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Pufferlösung

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCZ	Tocilizumab
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Transmembran-Helix
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
Tyr2	Tyrosinkinase 2
U	Uracil
U	<i>Unit</i>
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UMP	Uridinmonophosphat
ü.N.	Über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Variante
VEGF	<i>Vascular epithelial growth factor</i>
v/v	Volumenanteil (<i>volume-volume percentage</i>)
VSS	Verlängerte SH2-Subdomäne
w/v	Massenanteil (<i>weight-volume percentage</i>)
xPSM	Extrazelluläre Region von PSMA

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

Nomenklatur von Genen und Proteinen

Die Bezeichnung von Genen und Proteinen erfolgt anhand der Vorgaben des HUGO *Gene Nomenclature Committee*. Gen-Bezeichnungen werden kursiv (z.B. *IL-6*) und die entsprechenden Proteine nicht kursiv (z.B. IL-6) dargestellt.

Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a key player in inflammation and the main factor for the induction of acute phase protein biosynthesis. Further to its central role in many aspects of the immune system, IL-6 regulates a variety of homeostatic processes. Dysregulation of IL-6, however, can lead to chronic inflammation. Consequently, blockage of IL-6 signaling is an efficacious indication for the treatment of various autoimmune diseases and cancers associated with chronic inflammation.

This thesis describes the selection and characterization of a RNA-aptamer capable of binding to domain 3 (D3) of the interleukin-6 receptor (IL-6R). The selection of a protein domain specific aptamer was achieved by applying a two tier systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Soluble IL-6R (sIL-6R) was used as target molecule for the first three selection cycles to generate aptamers capable of binding to the receptor in its native form. The second phase of the SELEX was performed using the D3 of the receptor to solely select aptamers specific for this region of the target molecule. The enriched nucleic acid library was cloned and sequenced after confirming its affinity for both sIL-6R and IL-6R D3. Evaluation of the sequencing results yielded five sequence families (F1-5), three of which showed binding to the IL-6R in filter retention assays (FRA). However, none of the aptamers tested was able to block the sIL-6R for its ligand IL-6 or the signaling co receptor glycoprotein 130 (gp130). F4, the aptamer with the highest affinity for the sIL-6R ($K_d \approx 34$ nM), was minimized to 34 nt for further investigations and afterwards termed RNA aptamer for interleukin-6 receptor domain 3 (RAID3). Computational predictions and CD spectroscopy pointed to the presence of a G-quadruplex as the major structural determining feature of RAID3. Binding of the aptamer was not impaired by minimization; the affinity of RAID3 for the sIL-6R ($K_d \approx 54$ nM) in FRA was comparable to its full length parent F4 and was later confirmed by microscale thermophoresis ($K_d \approx 27$ nM). Laser scanning microscopy and flow cytometry experiments demonstrated that RAID3 was able to interact with the IL-6R on the surface of BaF3 cells. Finally, a 2'-deoxy-2'-fluoro-pyrimidine modified variant of RAID3 was prepared to enhance its stability under cell culture conditions. The fully modified RAID3 showed an unimpaired affinity for the sIL-6R ($K_d \approx 43$ nM) and strongly enhanced stability in cell culture medium supplemented with fetal bovine serum.

Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) nimmt eine Schlüsselposition in der Regulation von Entzündungen ein und ist der Hauptfaktor bei der Induktion der Akute-Phase-Proteinbiosynthese. Zusätzlich zu seiner zentralen Rolle in vielen Aspekten des Immunsystems reguliert IL-6 eine Vielzahl homöostatischer Prozesse. Die Dysregulation von IL-6 kann jedoch zur Entstehung chronischer Entzündungen führen. Daraus folgend hat sich das Blockieren der IL-6-vermittelten Signaltransduktion als wirksame Indikation für die Behandlung verschiedener Autoimmun- und Krebserkrankungen, die mit chronischer Entzündung assoziiert sind, erwiesen.

Diese Dissertation beschreibt die Selektion und Charakterisierung eines RNA-Aptamers für die Domäne 3 (D3) des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6R). Die Selektion eines Protein-Domäne-spezifischen Aptamers wurde durch eine zweistufige *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX) erzielt. Um Aptamere für den nativ gefalteten Rezeptor zu generieren, wurde zunächst löslicher IL-6R (sIL-6R) als Zielmolekül für die ersten drei Selektionszyklen eingesetzt. Die zweite Phase der SELEX erfolgte unter Verwendung der IL-6R D3, um nur diejenigen Aptamere mit Spezifität für diese Region des Rezeptors zu selektieren. Nach Abschluss der SELEX wurde die angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek kloniert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse resultierte in der Identifikation von fünf Sequenzfamilien, von denen drei in der Lage waren, den sIL-6R in Filterretentionsassays (FRA) zu binden. Keines der identifizierten Aptamere war jedoch zur Blockierung des sIL-6R für dessen Liganden IL-6 oder den signalweiterleitenden Co-Rezeptor Glykoprotein 130 (gp130) befähigt. F4, das Aptamer mit der höchsten Affinität für den sIL-6R ($K_d \approx 34$ nM) wurde auf 34 nt minimiert. Die verkürzte Form wurde als RNA-Aptamer für die IL-6R Domäne 3 (RAID3) bezeichnet. Computergestützte Vorhersagen und CD-spektroskopische Messungen deuteten auf das Vorhandensein eines G-Quadruplexes als hauptsächliches strukturbestimmendes Merkmal von RAID3 hin. Die Bindung des Aptamers an den sIL-6R wurde durch die Verkürzung nicht eingeschränkt; Die Affinität von RAID3 für den sIL-6R ($K_d \approx 54$ nM) entsprach dem des unverkürzten Vorläufers im FRA und konnte durch *microscale* Thermophorese verifiziert werden ($K_d \approx 27$ nM). Durch konfokale *laser scanning* Mikroskopie und Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass RAID3 zur Bindung an membrangebundenen IL-6R auf der

Oberfläche von BaF3 Zellen in der Lage ist und von diesen IL-6R-abhängig internalisiert wird. Abschließend wurde eine 2'-Deoxy-2'-fluoro-pyrimidin-Variante von RAID3 hergestellt, um die Stabilität des Aptamers unter Zellkulturbedingungen zu erhöhen. Während die Affinität von RAID3 durch die Modifikationen unbeeinflusst blieb ($K_d \approx 43$ nM), konnte eine deutliche Zunahme der Stabilität in Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum nachgewiesen werden.

1 Einleitung

1.1 Interleukin 6 – ein vielseitiges Zytokin

Als Zytokine werden pleiotrop agierende Botenstoffe mit teils redundanter Wirkung beschrieben. Ihnen werden Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren und viele Wachstumsfaktoren zugerechnet¹.

Die Interleukin-6-(IL-6)-Familie umfasst neben dem namensgebenden IL-6 hinaus IL-11, *Leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *ciliary inhibition factor* (CNTF) *cardiotropin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like related cytokine and stimulating neurotrophin-1/B-cell stimulation factor 3* (NNT-1), *neuropoietin* (NPN), IL-27 und IL-3^{1,2}. IL-6 moduliert nahezu jeden Aspekt des angeborenen Immunsystems, darunter Hämatopoese, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, B-Zell-Differenzierung und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten zu Infektions- und Trauma-Positionen durch Kontrolle der Granulopoese. IL-6 nimmt zusammen mit IL-1 und Tumornekrosefaktor α (TNF α) eine Schlüsselposition in Entzündungsreaktionen ein, die sich unter anderem in der Induktion der Akute-Phase-Proteinbiosynthese äußert³⁻⁶.

Neben seiner zentralen Rolle in der Regulation von Zellen des Immunsystems beeinflusst IL-6 eine Vielzahl von Prozessen, darunter vaskuläre Krankheiten, mitochondriale Aktivitäten, den Lipidstoffwechsel, Insulinresistenz, das neuroendokrine System und neuropsychologische Verhalten⁴.

IL-6 wird von einer Reihe von lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen, darunter T-Zellen, B-Zellen, Monocyten, Fibroblasten, Keratinocyten, Endothelzellen, Mesangialzellen und verschiedenen Tumorzellen, produziert⁷. Die Expression von *IL-6* wird hauptsächlich durch IL-1 β und TNF α induziert, kann aber auch in Folge des Einflusses anderer Faktoren wie *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), Prostaglandinen und Adipokinen im Verlauf der Stressantwort und als Reaktion auf andere Zytokine erfolgen⁴. Intrazellulär wird die IL-6-Produktion durch miRNAs (z.B. let-7a), RNA-bindende Proteine (z.B. Lin28B und Arid5a), RNasen (z.B. Regnase-1) und circadiane Kontrollfaktoren, wie Per1, reguliert⁸⁻¹⁰.

1.2 Interleukin-6 – Struktur und Signaltransduktion

Der IL-6-Rezeptorkomplex setzt sich aus dem Zytokin selbst, dem α -Zytokinrezeptor Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) und dem signalweiterleitenden Zytokinrezeptor gp130 zusammen¹ (Abbildung 1). Beide Rezeptoren werden der Klasse I Zytokinrezeptorfamilie zugeordnet. Diese zeichnet sich durch vier positionell konservierte Cysteine in der aminoterminalen und einem WSXWS-Motif in der carboxyterminalen Hälfte ihres Cytokinbindemoduls (CBM) aus. Auf einer Zielzelle bindet IL-6 zunächst an den IL-6R, woraufhin der entstandene IL-6/IL-6R-Komplex mit zwei Molekülen gp130 assoziiert und so die Signaltransduktion in die Zelle induziert. Während gp130 ubiquitär von allen kernhaltigen Zellen präsentiert wird und mit einer großen Zahl verschiedener Zytokinrezeptoren interagiert, ist die Expression von *IL-6R* größtenteils auf Hepatocyten, Megakaryocyten, Monocyten und Makrophagen sowie neutrophile Granulocyten und einige Leukocyten beschränkt^{1,11,12}.

IL-6 weist vier α -Helices auf, die in einer „Auf-Auf-Ab-Ab-Topologie“ angeordnet sind. Das Zytokin interagiert mit seinen Rezeptoren über drei distinkte Regionen, die als *Site* I-III bezeichnet werden. Zunächst wird die *Site* I des IL-6 durch das Zytokinbindemodul (CBM) des IL-6R gebunden. Dieses setzt sich aus den beiden Fibronectin-III-(FN III)-ähnlichen Domänen (D) 2 und D3 des Rezeptors zusammen. Dabei stellt D3 mit 70% den Großteil der Kontaktfläche zum IL-6 her. Von den 18 Aminosäureresten der Domäne 3, die mit dem Zytokin interagieren, fällt der Beitrag von Phenylalanin Phe229 und Phe279 wiederum mit 28% am größten aus^{13,14} (Abbildung 2).

Einleitung

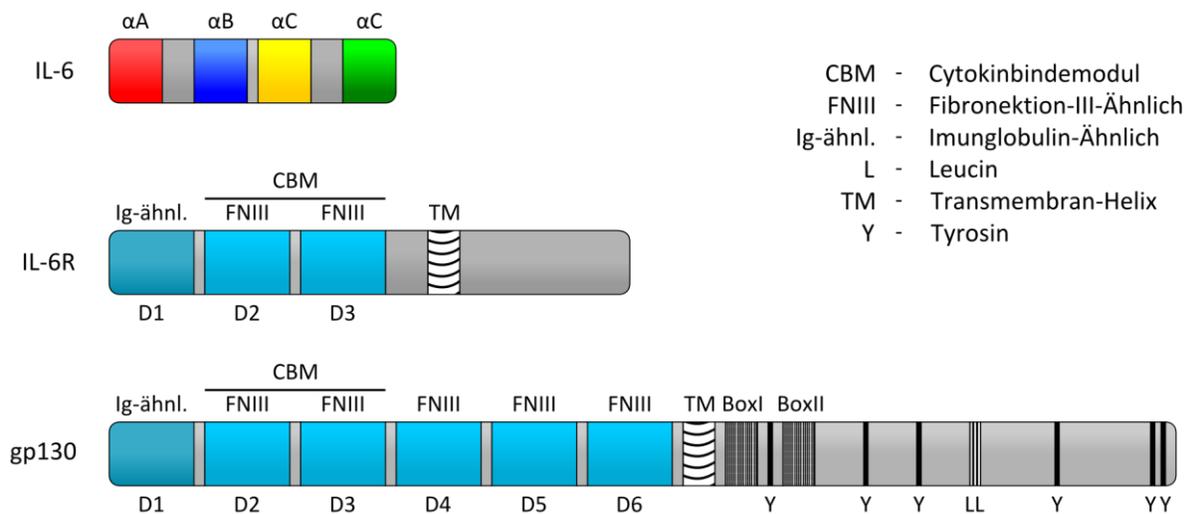


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Interleukin-6 (IL-6), dem Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) und Glykoprotein 130 (gp130).Abbildung verändert nach Herinrich *et al.*²

Ötzbek *et al.* konnten zeigen, dass die D3 des IL-6R alleine bereits dazu in der Lage ist, IL-6 zu binden, ohne jedoch anschließend gp130 rekrutieren zu können¹⁵. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne 1 (Ig-ähnlich) des IL-6R ist beim Menschen nicht an der Zytokinbindung beteiligt. Vermutlich spielt sie jedoch eine Rolle im intrazellulären Transport und der Stabilität des Rezeptor¹⁶. Interessanterweise findet in der Maus keine IL-6-vermittelte Signaltransduktion durch den IL-6R statt, wenn diesem die Domäne I fehlt¹⁷. Auch der cytoplasmatische Teil von IL-6R ist nicht direkt in die Signaltransduktion involviert, steuert jedoch den Transport des Rezeptors zur basolateralen Membran polarisierter Zellen¹⁸.

Nach Bildung des IL-6/IL-6R-Komplexes rekrutiert *Site II* des IL-6 gp130 über dessen CBM (FN III-Domänen 2 und 3). Ein zweites Molekül gp130 wird anschließend über *Site III* des IL-6 durch Interaktion mit der Ig-ähnlichen Domäne 1 des Co-Rezeptors verankert^{13,19-22}.

Einige Autoren gehen von der Bildung eines hexameren Signaltransduktionskomplexes mit einer 2/2/2 Stöchiometrie von IL-6/IL-6R/gp130 als aktiven Proteinkomplex aus^{4,13,23} (Abbildung 2).

Einleitung

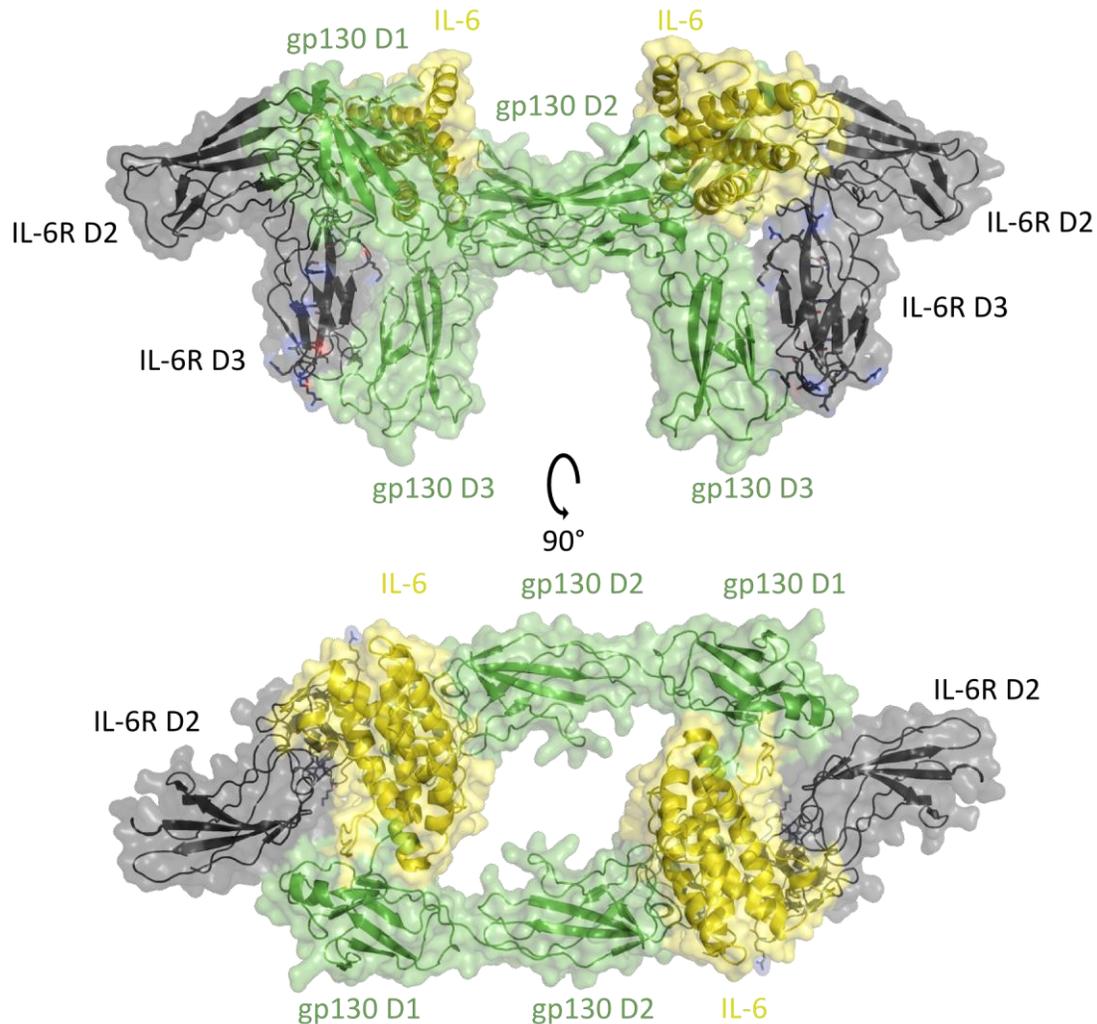


Abbildung 2: Kristallstruktur des IL-6-abhängigen Signaltransduktionskomplexes. Abgebildet ist die Kristallstruktur des IL-6 sowie der drei N-terminalen Domänen D1 (Ig-ähnlich) und D2-D3 (FNIII-ähnlich) des gp130 und der zytokinbindenden Domänen D2 und D3 des IL-6R. PDB-id: 1P9M¹³.

Funktionelle Studien mit physiologischen IL-6-Konzentrationen deuten jedoch auf eine 1/1/2 Stöchiometrie des aktiven Rezeptorkomplexes hin, der erst bei hohen IL-6-Konzentrationen in ein inaktives Hexamer übergeht^{22,24}

So weist die Stärke der Signaltransduktions-Aktivierung in Abhängigkeit der IL-6-Konzentration einen glockenkurvenförmigen Verlauf auf, bei der die Signaltransduktion zunächst zunimmt, nach dem Überschreiten eines Schwellenwertes der IL-6-Konzentration jedoch wieder sinkt und schließlich ganz inhibiert wird. Nach dem 1/1/2-Modell würde der IL-6 zunächst einen tetrameren Signaltransduktionskomplex mit einer 1:1:2 (IL-6/IL-6R/gp130) Stöchiometrie ausbilden, der bei

Einleitung

höheren IL-6-Konzentrationen und daraus folgender Sättigung des membranständigen IL-6R in ein inaktives Hexamer überführt wird²⁴.

Weitere Hinweise für die Hypothese eines tetrameren IL-6-abhängigen Signaltransduktionskomplexes konnten durch *fluorescence intensity multiple distribution analysis* (FIMDA) unter Verwendung des Designer-Zytokins Hyper-IL-6 gewonnen werden. Hyper-IL-6 stellt ein Fusionsprotein dar, in dem der C-Terminus von IL-6R mit dem N-Terminus von IL-6 über einen flexiblen Peptidlinker miteinander verknüpft sind. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Rezeptor und Ligand liegt IL-6 im Falle von Hyper-IL-6 praktisch konstant rezeptorgebunden vor und entspricht damit dem löslichen IL-6/sIL-6R-Komplex.

Affinitätsanalysen unter Verwendung von Hyper-IL-6 und dem vorformierten gp130 Dimer sgp130Fc zeigten, dass es bei niedrigen Proteinkonzentrationen zur Ausbildung eines Hyper-IL-6/sgp130Fc-Trimers kommt. Dieser würde in der natürlichen Entsprechung des Systems einen 1:1:2-Tetramer (IL-6/sIL-6/gp130) repräsentieren²². Im Zuge der Untersuchung durch FIMDA konnte bei einer Erhöhung der Hyper-IL-6-Konzentration zudem die Ausbildung eines tetrameren Hyper-IL-6/gp130 Komplexes (entspricht dem Hexamer aus IL-6/IL-6R/gp130) beobachtet werden²². Neben den für die Zytokinbindung verantwortlichen Domänen 1-3 des gp130 verfügt der Co-Rezeptor noch über drei membranproximale FN III Domänen. Diese sind nicht direkt an der Zytokinbindung beteiligt, koppeln jedoch die Ligandenbindung mit der Signaltransduktion^{25,26}.

Anhand des gp130/LIF-Rezeptor (LIFR)-Heterodimers konnte gezeigt werden, dass diesem membranproximalen FN III Domänen die Dimerisierung des Rezeptors ermöglichen²⁷. Indem sie die extrazelluläre Region von gp130 und damit auch die Transmembranhelices in räumliche Nähe zueinander bringen, könnten sie die Voraussetzungen für die Weiterleitung des IL-6 vermittelten Signals ins Zellinnere schaffen.

Für einige Zytokinrezeptoren, darunter gp130, wird die Möglichkeit präformierter Homodimere auf der Zelloberfläche diskutiert. Dieses Modell beinhaltet jedoch intrinsische Schwierigkeiten, da gp130 je nach Ligand mit verschiedenen Zytokinrezeptoren, z.B. LIFR und OSM-Rezeptor (OSMR), dimerisiert. Obwohl gp130 im Falle einer ligandenunabhängigen Dimerisierung für ein begrenztes Spektrum an Interaktionspartnern prädisponiert wäre, deuten einige experimentelle Befunde in diese Richtung^{2,22,28-30}. So konnte gezeigt werden, dass die Affinität von löslichem gp130 (sgp130)

Einleitung

für den Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6R (sIL-6R) niedriger ist, als es für membranständiges gp130 der Fall ist. Die Affinität von sgp130Fc für IL-6/sIL-6R, in dem sgp130 durch einen C-terminalen Fc-Teil bereits dimerisiert vorliegt, entspricht mit 60 pM jedoch dem von membranständigem gp130²².

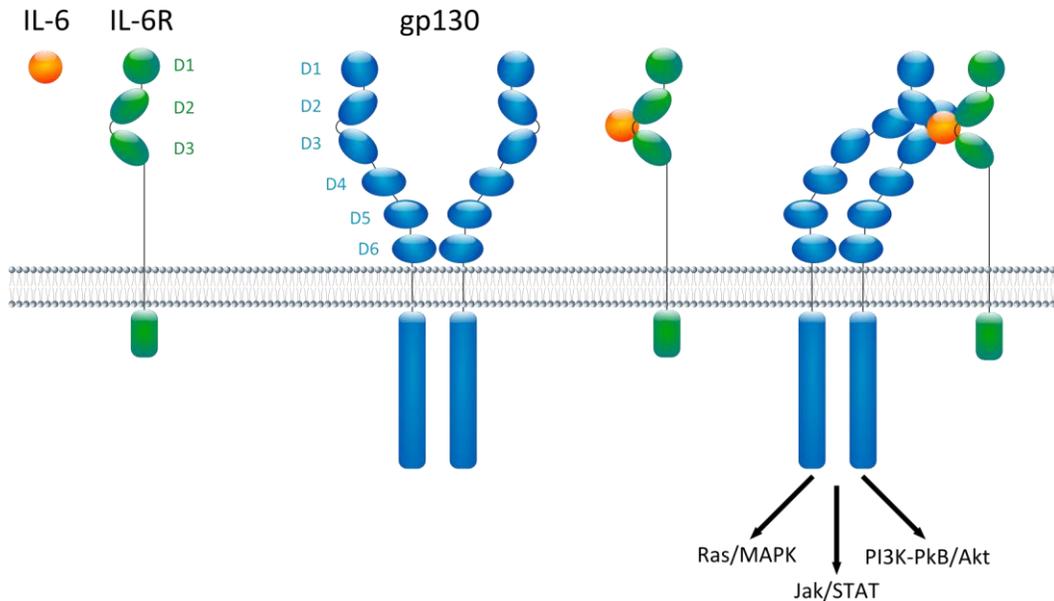


Abbildung 3: Schematische Darstellung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion durch Bindung von Interleukin-6 (IL-6) an den membranständigen Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) und anschließender Assoziation mit zwei Molekülen Glykoprotein 130 (gp130).

Intrazellulär resultiert die Zytokinbindung durch zwei gp130 unter anderem in der Aktivierung der Jak/STAT-Signalkaskade. Von den vier Mitgliedern der Janus-Kinase (Jak) Familie sind drei, Jak1, Jak2 und Tyrosinkinase 2 (Tyr2), mit gp130 assoziiert^{31,32} (Abbildung 4). Jak1 scheint hierbei eine essentielle Rolle einzunehmen. Zellen, denen diese Tyrosinkinase fehlt, weisen eine stark eingeschränkte IL-6-abhängige Signaltransduktion auf³³.

Jaks binden nicht-kovalent an die sogenannten Box1- und Box2-Motive der membranproximalen Domäne des gp130³⁴.

Nach der Zytokinbindung werden die Jaks zunächst autophosphoryliert und phosphorylieren daraufhin konservierte Tyrosinreste des gp130³⁵. Das phosphorylierte gp130 rekrutiert anschließend Transkriptionsfaktoren der STAT- (*signal transducer and activator of transcription*) Familie (Abbildung 4), die an die membrandistalen Phosphotyrosine γ^{767} , γ^{814} , γ^{905} , γ^{915} binden³¹ (Abbildung 1). Die STAT-Familie von Transkriptionsfaktoren ist in Säugetieren durch sieben Mitglieder vertreten, die als STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b und -6 bezeichnet werden. Alle IL-6-Typ

Einleitung

Zytokine aktivieren STAT3 und zu einem geringeren Grad auch STAT1 und STAT5^{31,36}. STATs binden transient über ihre Src-Homologie 2-(SH2-)Domäne als Monomer an phosphoryliertes gp130 und werden daraufhin durch Jaks Tyrosin-phosphoryliert^{37,38}.

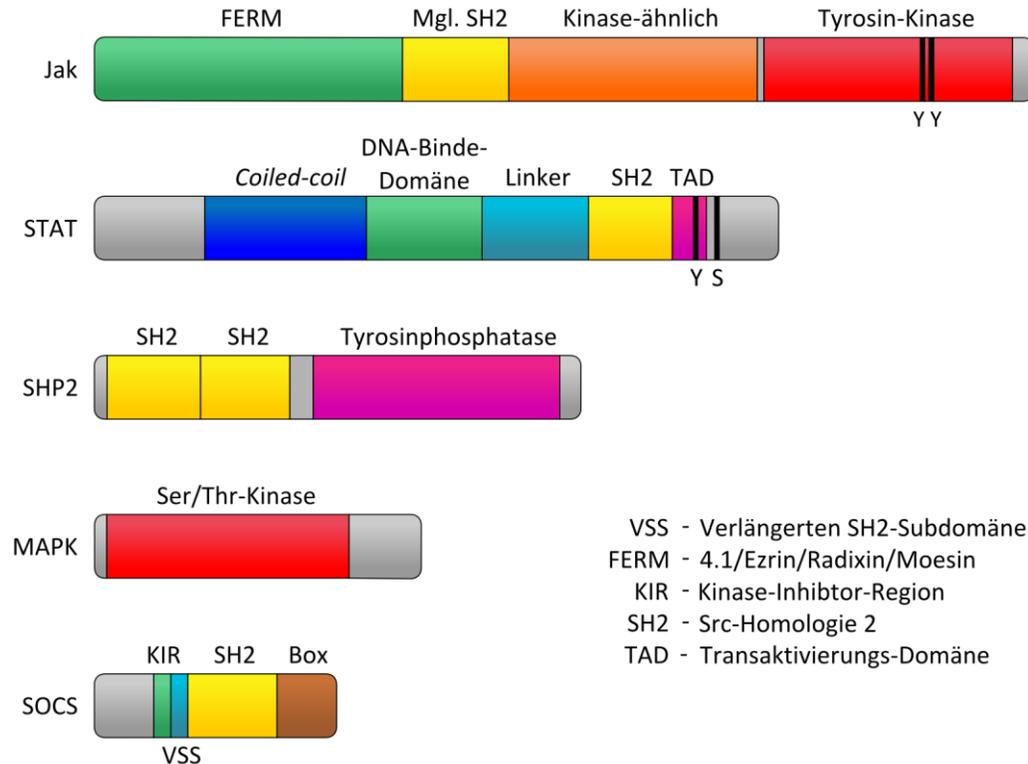


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Januskinase (Jak), *signal transducer and activator of transcription* (STAT), *SH2 containing tyrosine phosphatase* (SHP2), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und *suppressor of cytokine signaling* (SOCS). Abbildung verändert nach Heinrich *et al.*².

Nach Dissoziation von gp130 dimerisieren zwei phosphorylierte STATs, ebenfalls in Abhängigkeit von ihrer SH2-Domäne, und bilden den aktiven Transkriptionsfaktor³⁹. Der aktive Transport von STAT-Faktoren in den Zellkern ist abhängig von der Phosphotyrosin induzierten Dimerisierung des Transkriptionsfaktors⁴⁰⁻⁴².

Neben dem gut untersuchten Jak/STAT-Signalweg induziert die IL-6-abhängige Signaltransduktion auch die Ras/MAPK- und PI3K-PKB/Akt-Signalkaskade^{11,12}.

Die IL-6-induzierte Aktivierung der MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) erfordert zunächst die Jak1-abhängige Rekrutierung von *SH2 containing tyrosine phosphatase* (SHP2, Abbildung 4) zu Phosphotyrosin⁷⁵⁹ von gp130^{43,44}. SHP2 wird daraufhin ebenfalls von Jak1 phosphoryliert, was zur Assoziation von Grb2/SOS (*growth-factor-bound-protein/son of sevenless*) an SHP2 und der *Rat*

Einleitung

sarcoma-(Ras)-abhängigen Aktivierung von MAPK führt. Neben der Aktivierung der Ras/MAPK-Kaskade fungiert SHP2 auch als negativer Regulator des Jak/STAT-Signalweges; in dem es unter anderem vermutlich STAT3 dephosphoryliert^{45–48}. Dies kann zu einer Verschiebung der Balance vom Jak/STAT zum Ras/MAPK-Weg führen und damit die Signalspezifität von gp130 modulieren. Während der STAT3-Signalweg mit Magenadenomen, autoimmuner Arthritis und gesteigerter T-Helferzellen-1-(T_H1)-Zytokinexpression korreliert, wird der MAPK-Signalweg mit reduzierter Akute-Phase-Protein-Produktion und gesteigerter T_H-Zelle-2-Zytokinexpression in Verbindung gebracht³¹.

Darüber hinaus kann IL-6 induziert auch die *phosphoinositide-3-kinase-protein-kinase-B/Akt* (PI3K-PKB/Akt)-Signalkaskade aktiviert werden. Dieser Signalweg spielt eine Rolle im Schutz gegen Apoptose und verstärkter Proliferation von Zellen im multiplen Myelom⁴⁹.

Eine Reihe von Mechanismen führt zur Termination der IL-6-abhängigen Signalkaskade und verhindert so Überstimulation durch das Zytokin. Ein Dileucin-Internalisierungsmotiv in der cytoplasmatischen Domäne von gp130 leitet die schnelle Internalisierung des IL-6/IL-6R/gp130-Rezeptorkomplexes ein und verhindert damit die erneute Aktivierung des Rezeptors¹.

Neben der bereits erwähnten SHP2 spielen Negativ-Regulatoren der *Suppressor of cytokin signaling*-(SOCS)-Familie (CIS und SOCS1–SOCS7, Abbildung 4) eine zentrale Rolle in der Suppression der IL-6-abhängigen Signaltransduktion. Die Expression von *cytokine-inducible-SH2-protein* (CIS) sowie *SOCS1-3* wird durch IL-6 massiv hochreguliert. Die Aktivierung erfolgt dabei durch den Jak/STAT-Signalweg, weshalb SOCS als klassische *Feedback*-Inhibitoren angesehen werden^{4,31}.

SOCS3 bindet mit hoher Affinität dasselbe Phosphotyrosin (Y759) wie SHP2 und interagiert anschließend über seine SH2-Domäne mit der Aktivierungsschleife von Jak2^{50,51}.

Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) interagieren direkt mit Tyrosin-phosphoryliertem STAT und regulieren so die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Während PIAS1 spezifisch die DNA-Bindung von aktiviertem STAT1 verhindert, inhibiert PIAS3 direkt STAT3^{52,53}.

1.3 IL-6 in der Pathogenese

IL-6 nimmt eine Schlüsselrolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen ein. Dies zeigt sich deutlich an dem zentralen Einfluss, den das Zytokin auf die

Einleitung

Pathogenese von rheumatischer Arthritis⁵⁴, systemischem Lupus erythematodes⁵⁵ und Morbus Castleman^{56,57} einnimmt. Nicht zu vernachlässigen ist der Einfluss IL-6-assoziierter chronischer Entzündungen in der malignen Transformation. Eine Reihe von Studien konnte einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von IL-6 und dem Verhalten von Tumoren, wie z.B. Proliferation, Differenzierung von Tumorzellen, Apoptose, Wachstum und Metastasierung, feststellen^{12,58–60}. Dem gegenüber stehen jedoch die homöostatischen Funktionen des Zytokins. So ist IL-6 am Glucosemetabolismus, der Hämatopoese, der Regulation des neuroendokrinen Systems beteiligt und spielt eine zentrale Rolle in der Wundheilung^{61–65}. Eine Übersicht der Auswirkungen der IL-6-vermittelten Signaltransduktion ist in Abbildung 5 gegeben.

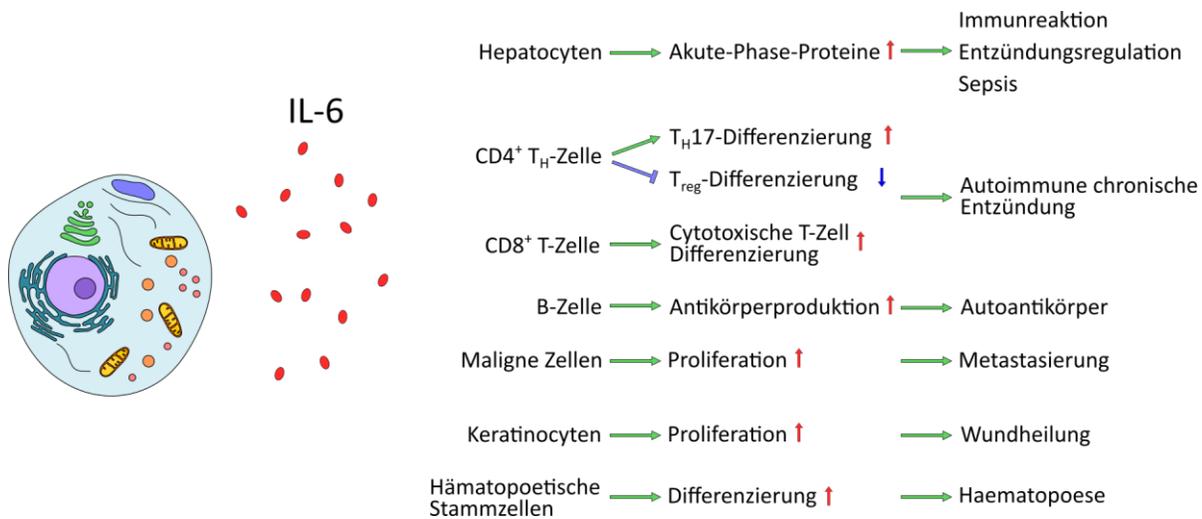


Abbildung 5: Auswahl der pleiotropen Effekte von IL-6 in Pathogenese und Homöostase. Abbildungskonzept und Inhalt teilweise aus Tanaka *et al.*⁶⁶ übernommen

Wie lässt sich das breite Wirkspektrum eines Zytokins erklären, dessen α -Rezeptor nur von einer begrenzten Anzahl von Zellen exprimiert wird? Lösliche Zytokinrezeptoren wirken in der Regel als Antagonisten. Während dies für IL-1 α oder TNF α zutrifft^{67–69}, ist der lösliche IL-6R (sIL-6R) jedoch zur Aktivierung von Zellen befähigt, die selbst keinen IL-6R auf ihrer Oberfläche präsentieren¹. Dieser Prozess wird als *Trans-Signaling* bezeichnet; ihm gegenüber steht die so genannte klassische Signaltransduktion durch membrangebundenen IL-6R.

Während die klassische Signaltransduktion von IL-6 mit den homöostatischen Funktionen des Zytokins in Verbindung gebracht wird, scheint die IL-6-abhängige Pathogenese vor allem im Zusammenhang mit dem *Trans-Signaling* zu stehen⁷⁰. Myeloide Zellen, d.h. Monozyten und aktivierte T-Zellen, sind mit ca. 60% die Hauptquelle für sIL-6R^{64,71,72}. Weitere 30% gehen auf

Einleitung

Hepatocyten zurück⁶⁴. sIL-6R entsteht entweder durch alternatives Splicen der mRNA oder limitierte Proteolyse der extrazellulären Region des Rezeptors. Letzteres ist mit einem Anteil von 90 - 99% der Hauptmechanismus für die Entstehung von sIL-6R⁷³. Die Spaltung des IL-6R wird dabei vor allem durch die membranständigen Proteasen *A Disintegrin and Metalloproteinase* (ADAM) 10 und 17 katalysiert. Während ADAM 10 den IL-6R vermutlich konstitutiv, jedoch mit geringem *turn over*, abspaltet, setzt ADAM 17 nach Aktivierung schnell große Mengen sIL-6R frei⁷⁴. So wird bei neutrophilen Granulozyten durch Apoptose unabhängig vom auslösenden Stimulus sIL-6R durch ADAM 17 freigesetzt⁷⁵.

Dies spiegelt sich auch in der Konzentration von sIL-6R im Serum wieder, die im Laufe einer Entzündung um den Faktor 2-3 des Grundlevels (25-50 ng/mL) erhöht ist⁴. Lösliches gp130 (sgp130) fungiert als natürlicher Antagonist zum sIL-6R, indem es den IL-6/sIL-6R-Komplex bindet und so dessen Interaktion mit membranständigem gp130 verhindert. Die sgp130-Konzentration im Serum beträgt 250-400 ng/mL, ändert sich aber im Laufe einer Entzündung nicht und fungiert vermutlich als Puffer, der sIL-6R unter normalen Bedingungen sofort neutralisiert^{76,77}.

sIL-6R kann dementsprechend als Marker für eine Reihe von Krankheiten, die direkt oder indirekt mit Entzündungen assoziiert sind, angesehen werden. Rheumatoide Arthritis zeichnet sich durch erhöhte sIL-6R Konzentrationen aus⁷⁸, beim multiplem Myelom korreliert die hohe Konzentration des löslichen Rezeptors 10-200 ng/mL direkt mit einer schlechten Prognose⁷⁹ und auch während einer Sepsis erhöht sich die Menge (bis zu 166 ng/mL) an sIL-6R stark⁸⁰.

1.4 Strategien zur Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion

Die zentrale Rolle von IL-6 in der Pathogenese chronischer Entzündungen und auch damit assoziierter Krebserkrankungen hat zur Entwicklung diverser Strategien zur Blockierung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion geführt (Abbildung 6). Als besonders erfolgreich haben sich therapeutische Antikörper (AK) in der Bekämpfung der durch IL-6 ausgelösten Symptome herausgestellt. Erste Versuche, direkt Anti-IL-6-AKs einzusetzen, führten jedoch zu Komplikationen. Obwohl die AKs die IL-6-vermittelte Signaltransduktion effektiv inhibierten, verhinderte das hohe Molekulargewicht des entstandenen Immunkomplexes (>>40 kDa) die renale Ausscheidung des IL-6. Es bildete sich deshalb ein Reservoir des Zytokins⁸¹. Die so enorm erhöhte IL-6-Konzentration erlaubte die Dissoziation des IL-6 vom Immunkomplex durch den IL-

Einleitung

6R. Erst der zeitgleiche Einsatz von drei AKs, die verschiedene Epitope des IL-6 binden, konnte dieses Problem lösen. Der so gebildete multimere Immunkomplex führte zur Quervernetzung von Fc-Rezeptoren, schnellen Endocytose durch Hepatocyten und damit Entfernung von IL-6 aus dem Serum⁸². Klinisch erfolgreicher war jedoch der gegen den IL-6R gerichtete, monoklonale Antikörper (mAB) Tocilizumab (TCZ)⁸³. Dieser humanisierte AK wurde 2010 zur Behandlung von moderater bis schwerer rheumatischer Arthritis zugelassen und zeigte in einer Reihe klinischer Studien vielversprechende pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften⁸⁴. Bei früher Anwendung kann TCZ nicht nur die Symptome der rheumatischen Arthritis bekämpfen, sondern auch zur Remission der Krankheit und Reparatur der Knochenerosion führen^{85,86}. Auch in der Behandlung weiterer, mit chronischer Entzündung assoziierter Krankheiten wie systemischem Lupus erythematosus⁸⁷ und Morbus Crohn⁸⁸ wurden vielversprechende Erfolge mit TCZ erzielt. Deutliche Effekte bei der Linderung klinischer Symptome bei gleichzeitig akzeptablem Sicherheitsprofil in der Behandlung von Patienten mit Morbus Castleman führten zur Zulassung von TCZ für die Behandlung der Krankheit in Japan⁸⁹. Zusammen mit vielversprechend verlaufenden präklinischen Studien in der Behandlung von Eierstockkrebs¹², des Plattenepithelkarzinoms^{90,91} und des Multiplen Myeloms⁹² konnte durch TCZ das therapeutische Potential der gezielten Blockierung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion umfangreich demonstriert werden.

Einleitung

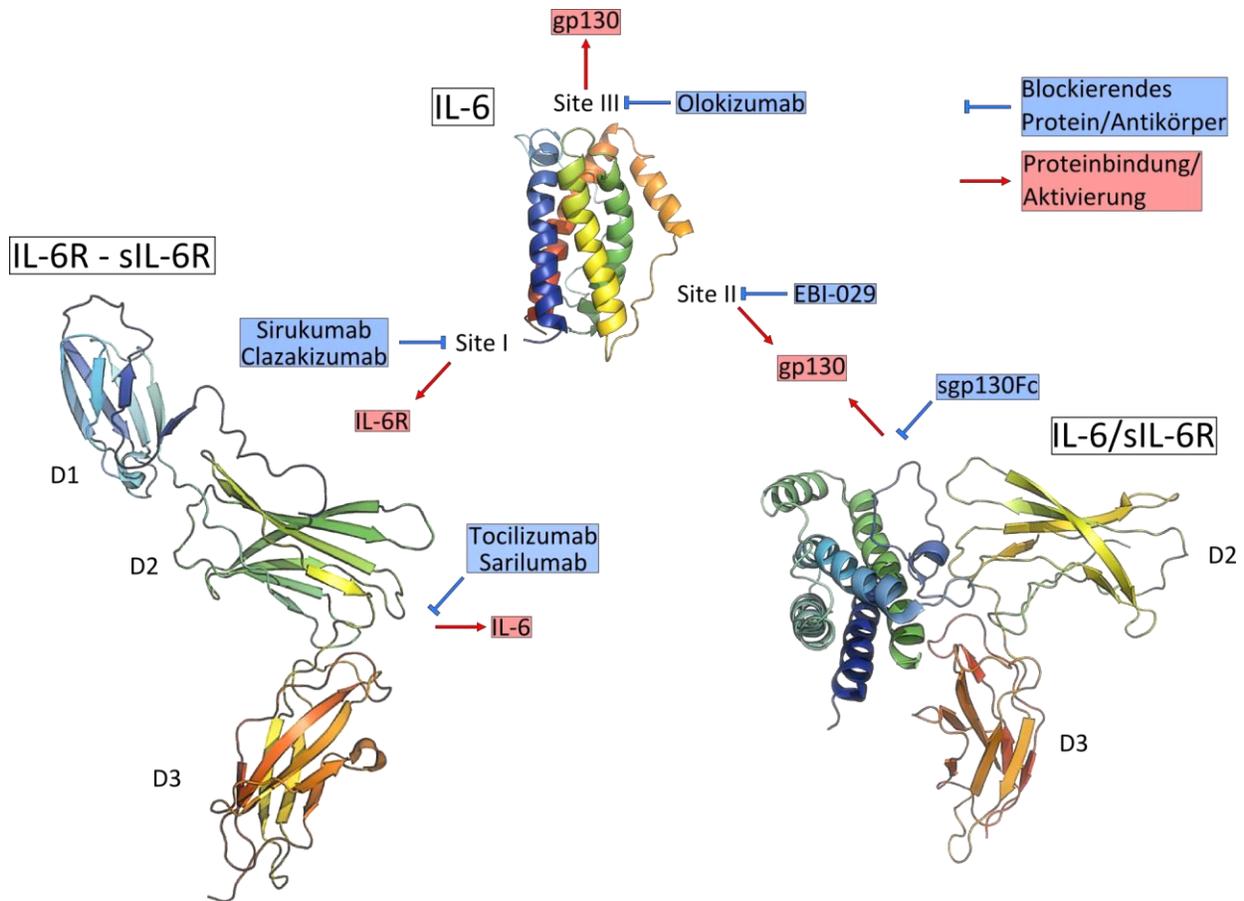


Abbildung 6: IL-6-Signaltransduktion blockierende Antikörper sowie das *Trans-Signaling* blockierende Fusionsprotein aus löslichem gp130 und dem Fc-Teil eines IgG-Antikörpers (sgp130Fc). Teile des Abbildungskonzepts wurden aus Hunter & Jones⁴ übernommen; Interleukin-6 (IL-6) PDB-id:1IL6; Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) PDB-id: 1N26; IL-6-Rezeptor-Komplex PDB-id: 1P9M.

Trotz dieser positiven Bilanz kann das systemische Blockieren des IL-6R ungewollte Komplikationen nach sich ziehen. IL-6 ist an einer Vielzahl homöostatischer Prozesse beteiligt und wichtig für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort. Im Mausmodell einer Listerien-Infektion führte die Verabreichung von TCZ zur Blockierung der Produktion des Akute-Phase-Proteins Serumamyloid A und erhöhtem Bakterien-Titer in Milz und Leber⁹³. Ein Lösungsansatz ist die gezielte Blockierung des *Trans-Signaling* durch sgp130. Hier bleiben die hauptsächlich durch klassische Signaltransduktion vermittelten homöostatischen Effekte von IL-6 unbeeinflusst. Die natürliche Pufferfunktion von sgp130 für den IL-6/sIL-6R-Komplex konnte durch Fusion der von sgp130 mit dem Fc-Teil eines IgG1-AKs und der daraus resultierenden Dimerisierung noch verbessert werden^{94,95}. Dieser Designer-Zytokinrezeptor (sgp130Fc) weist im Vergleich zum natürlichen sgp130 ein zehnfach höheres inhibitorisches Potential gegenüber dem *Trans-*

Einleitung

Signaling auf⁹⁴. Die Vorteile der zielgerichteten Blockierung des *Trans-Signaling* konnten im murinen Sepsis-Model demonstriert werden. Im Vergleich zur globalen Inhibition der IL-6-vermittelten Signaltransduktion durch einen AK stieg die Überlebensrate durch die Blockierung des *Trans-Signaling* mittels sgp130Fc von 45% auf 80%. Wurde sgp130Fc vor Induktion des septischen Schocks verabreicht, stieg die Überlebensrate sogar auf 100%, während sie im Falle des IL-6-blockierenden AK unverändert bei 45% lag. In der Sepsis übertrifft die IL-6-Konzentration die des sIL-6R; während die negativen Effekte des *Trans-Signaling* durch sgp130Fc effektiv inhibiert wurden, stand IL-6 deshalb zur Stimulation der regenerativen Proliferation des Magenepithels zur Verfügung⁹⁶.

sgp130Fc hat auch in einer Reihe präklinischer Studien im Tiermodel humaner Krankheiten wie chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, experimenteller Arthritis, Arteriosklerose, Lupus erythematodes sowie dem Model des Colitis-assoziierten Darmkrebs seine Wirksamkeit unter Beweis gestellt^{72,78,97-99}.

1.5 Aptamere

Ribosomen vermitteln eine der, evolutionsbiologisch betrachtet, ältesten Funktionen in der Geschichte des Lebens. Die Translation der in den Genen gespeicherten Informationen in ihr funktionelles Äquivalent in Form von Proteinen ist allen bekannten Lebewesen gemein und Kerngedanke des „zentralen Dogmas der Molekularbiologie“. Die kanonische Aufteilung von Nukleinsäuren als Speichermedium der genetischen Information und Proteinen als deren katalytische Agenten stellte sich jedoch als zu vereinfacht heraus. Ironischerweise war es die Untersuchung der Ribosomen selbst, die half, die elementare Rolle von RNAs in der Katalyse und Regulation biochemischer Prozesse zu erhellen. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass es die Proteinuntereinheiten dieser Makromoleküle sind, die die Übersetzung der mRNA in ein Polypeptid katalysieren, während den drei (bei Eukaryoten vier) RNA-Komponenten rein strukturelle Aufgaben zugerechnet wurden. Die Aufklärung der Ribosomen-Struktur zeigte jedoch, dass es sich genau umgekehrt verhält und dass es tatsächlich die RNA-Untereinheiten sind, welche die Synthese der Peptidbindung neu entstehender Proteinketten katalysieren¹⁰⁰.

Die Feststellung, dass RNAs eine der grundlegendsten biochemischen Reaktionen katalysieren, führte zu Formulierung der RNA-Welt-Hypothese, nach der die ersten Vorfahren des Lebens über

Einleitung

ein RNA- oder RNA-ähnliches Genom verfügten. Dieses diente nicht nur der Speicherung der genetischen Information, sondern katalysierte auch alle für Stoffwechsel, Homöostase und Replikation notwendigen Reaktionen¹⁰¹.

Die chemische Diversität Nukleinsäure-vermittelter Interaktionen konnte zu Beginn der 1990er durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander experimentell gezeigt werden. Indem sie eine Nukleinsäure-Bibliothek mit randomisierten Sequenzen und hoher Diversität alternierend mit einem immobilisierten Zielmolekül inkubierten und die gebundene Fraktion anschließend *in vitro* amplifizierten, konnten sie Nukleinsäure-basierte Liganden für dieses Zielmolekül anreichern^{102,103}. Spezifität und Affinität dieser als Aptamere bezeichneten Oligonukleotide ließen sich mit denen von Antikörpern vergleichen und erklären ihre rasche Transition von der Grundlagenforschung in die angewandte Wissenschaft. Anders als ihre proteinbasierten Äquivalente sind Aptamere unabhängig von zellulären Systemen für Selektion und Produktion und weisen wenig bis keine Immunogenität, geringe Produktionskosten sowie nahezu keine Variabilität zwischen unterschiedlichen Chargen auf^{104,105}. Die kostengünstige Synthese und Modifikation von Aptameren spiegelt sich in der Vielfalt ihrer Anwendungen wieder. Aptamere finden mittlerweile Gebrauch in Chromatographie¹⁰⁶, als Biosensoren¹⁰⁷, in Diagnostik¹⁰⁸ und Therapie¹⁰⁹ sowie der als Theranostik bezeichneten Fusion letzterer¹¹⁰. Ebenso vielfältig wie die Applikationen sind die Zielgruppen, für die erfolgreich Aptamere selektiert werden konnten. Die Bandbreite überspannt kleine Moleküle wie Fluorophore¹⁰³, Peptide¹¹¹, Proteine¹¹², Viren¹¹³, Zellen¹¹⁴ und, wie im Falle von Aptameren, die die Blut-Hirnschranke überwinden, sogar ganze Organe¹¹⁵.

1.6 Aptamer-Selektion

Aptamere werden durch die sogenannte *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) angereichert. Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion von Aptameren ist eine Nukleinsäure-Bibliothek hoher Diversität. Der modulare Aufbau der Oligonukleotide ist an die Anforderungen der SELEX, hohe strukturelle Vielfalt bei gleichzeitiger Amplifizierbarkeit, angepasst und folgt grundsätzlich einem gleichbleibenden Schema. Jedes Oligonukleotid enthält drei distinkte Regionen. Die terminalen Bereiche zeichnen sich durch konstante Sequenzen aus, die der Primer-Bindung während des Amplifikationsschrittes dienen. Die Kernregion weist eine

Einleitung

randomisierte Basenfolge variabler Länge auf, die sich sequenzabhängig faltet und es einigen Molekülen der Nukleinsäure-Bibliothek ermöglicht, spezifisch mit dem Zielmolekül zu interagieren. Auf DNA-Ebene erfolgt die Benennung der Regionen der Nukleinsäure-Bibliothek und folglich die Einteilung der Konstanten Regionen in 5'- und 3'-Region bezogen auf den Sinnstrang (Abbildung 7).

- 5'- Konstante Region mit *T7-Promotor*
- 5'- Konstante Region ohne *T7-Promotor*
- Randomisierte Kernregion
- 3'- Konstante Region

DNA Bibliothek R1, 128 bp

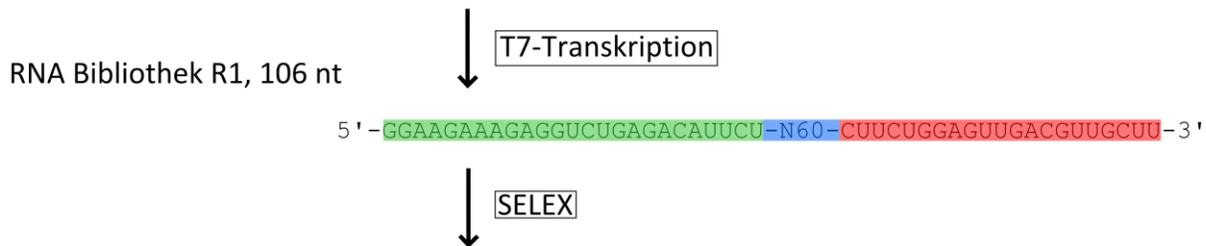


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der SELEX RNA-Bibliothek R1. Die R1 Nukleinsäure-Bibliothek weist von 5'- nach 3' (bezogen auf den Sinn-Strang) zunächst einen kurzen flankierenden Bereich gefolgt von einem Klasse 2 T7-Promotor (kursiv) auf. In grün ist die 5'-konstante Region des Transkriptionsprodukts dargestellt, die auch die beiden 3'-terminalen Guanine des T7-Promotors beinhaltet. Die Kernregion (Blau) umfasst 60 randomisierte Basen und wird am 3'-Ende von der 3'-konstanten Region flankiert.

Im ersten Schritt der SELEX werden Zielmolekül und Nukleinsäure-Bibliothek gemeinsam inkubiert, um es den Oligonukleotiden mit struktureller Komplementarität zum Zielmolekül zu ermöglichen, an dieses zu binden. Obwohl die Diversität einer Nukleinsäure-Bibliothek mit bis zu 10^{15} individuellen Sequenzen sehr hoch ist, reicht sie nicht aus um alle theoretisch möglichen Basenfolgen abzudecken. Eine randomisierte Kernregion aus 30 Nukleotiden kann theoretisch bereits $>10^{18}$ mögliche Basenkombinationen einnehmen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass jedes Oligonukleotid zu Beginn einer SELEX eine Kernregion mit einer einzigartigen Sequenz aufweist. Dementsprechend werden für den ersten SELEX-Zyklus generell milde Selektionsbedingungen gewählt, um möglichst keine potentiellen Aptamer-Kandidaten zu verlieren¹¹⁶.

Einleitung

Die *in vitro*-Inkubation mit dem Zielmolekül stellt bereits einen entscheidenden Vorteil gegenüber Antikörpern dar, da sie es erlaubt, Aptamere auch unter nicht-physiologischen Bedingungen für toxische oder nicht-immunogene Zielmoleküle zu erzeugen¹¹⁷. Pufferbedingungen, Temperatur und Inkubationszeit können zudem an die Anforderungen angepasst werden, die sich aus der späteren Anwendung der Aptamere herleiten¹¹⁶. Auf die Inkubation mit dem Zielmolekül folgt die eigentliche Selektion der Aptamere durch Separation der gebundenen Fraktion von den frei vorliegenden Oligonukleotiden. In vielen Fällen liegt das Zielmolekül immobilisiert vor und kann so vom Überstand, der die ungebundene Nukleinsäure-Fraktion enthält, getrennt werden. Die Immobilisierung kann beispielsweise durch Kopplung an die Matrix einer Säule oder Membranfiltration erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass unspezifische Interaktionen zwischen Nukleinsäure und Matrix möglichst gering zu halten sind und das Matrixmaterial entsprechend auszuwählen ist. Häufig werden zusätzlich Präselektionsschritte in die SELEX integriert, in denen die Nukleinsäure-Bibliothek vor dem eigentlichen Selektionsschritt mit der reinen Matrix inkubiert und im Anschluss nur der frei vorliegende Überstand in die SELEX eingesetzt wird. Auf diesem Weg lässt sich die Anreicherung von matrixbindenden Aptameren verhindern¹¹⁶. Die Gegenselektion stellt eine Möglichkeit dar, die Selektion von hochspezifischen Aptameren zu begünstigen. Hier wird ein chemisch ähnliches Molekül, beispielsweise ein homologes Protein, verwendet, um unspezifisch bindende Aptamere mit Kreuzreaktivität abzureichern. Insbesondere paramagnetische Partikel haben sich für die einfache Selektion von Aptameren für immobilisierte Zielmoleküle etabliert, da sie die zügige Separation der gebundenen Oligonukleotid-Fraktion von freien Nukleinsäuren im Überstand bei sehr geringem Volumen und einfacher Handhabung ermöglichen¹¹⁸.

Üblicherweise folgen auf das Entfernen des Überstandes Waschschrte, deren Stringenz im Verlauf der SELEX erhöht wird, um den Selektionsdruck hin zu Aptameren mit hoher Affinität für das Zielmolekül zu verschieben. Anschließend werden die gebundenen Aptamere vom Zielmolekül eluiert und durch PCR (oder RT-PCR gefolgt von einer *in vitro*-Transkription, im Falle von RNA-Aptameren) amplifiziert. Der Verlauf einer RNA-SELEX mit paramagnetischen Partikeln ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Einleitung

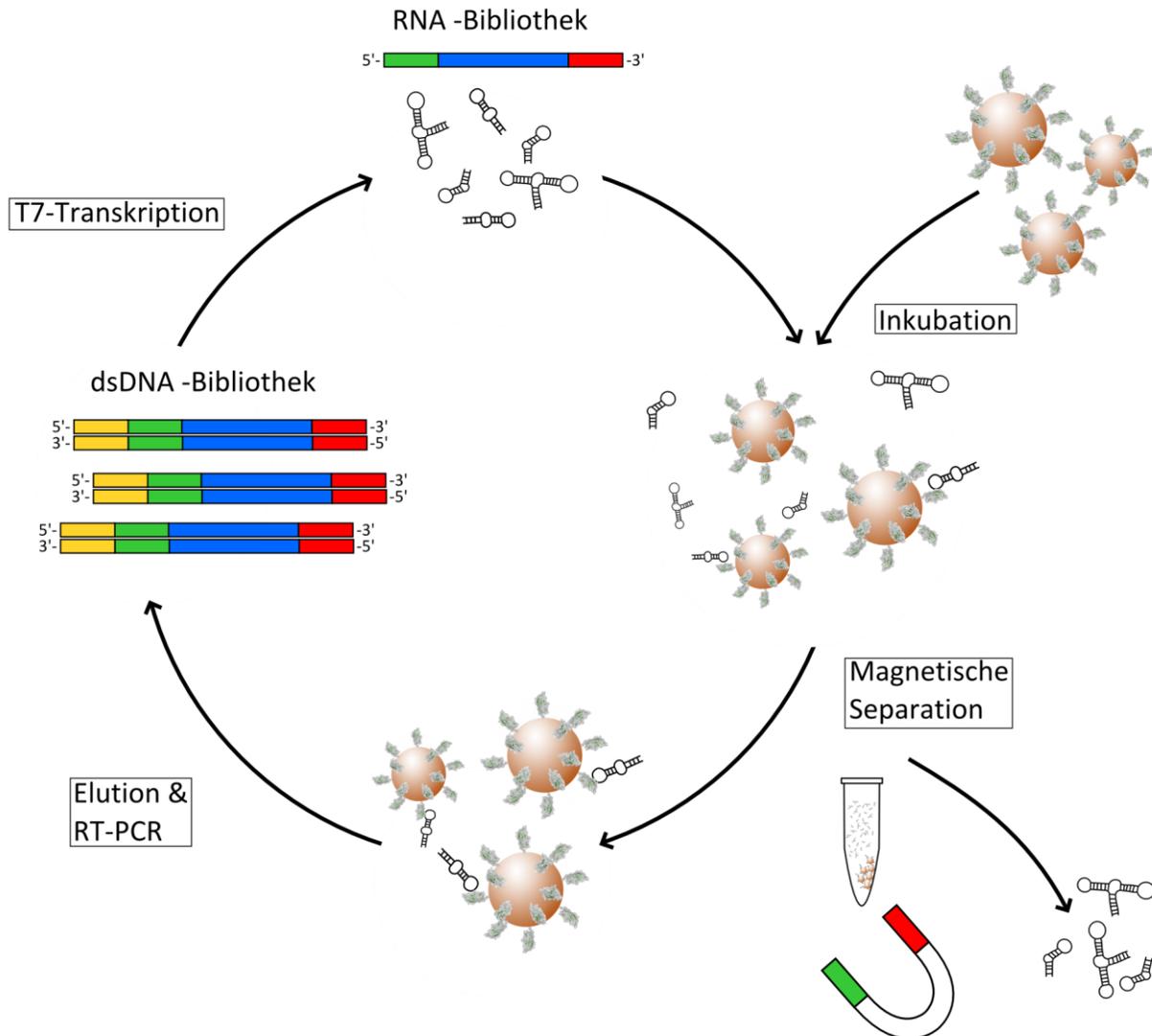


Abbildung 8: Schematische Darstellung der SELEX von RNA-Aptameren mittels paramagnetischer Partikel. Zunächst wird die randomisierte Nukleinsäure-Bibliothek zusammen mit dem immobilisierten Zielprotein inkubiert. Inkubationsbedingungen und Dauer können dabei auf die späteren Anforderungen für die geplante Anwendung des Aptamers ausgerichtet werden. Auf die Inkubation folgt die magnetische Separation, in der der Überstand zusammen mit nicht gebundene Nukleinsäuren entfernt wird. Gebundene Aptamere werden dann vom Zielmolekül eluiert und durch RT-PCR amplifiziert. Die angereicherte Nukleinsäure-Bibliothek wird dann in RNA umgeschrieben und in einen weiteren Selektionszyklus eingesetzt.

Als vielversprechend hat sich die Kombination von paramagnetischen Partikeln und Mikrofluidik-Chips erwiesen. Diese mikromagnetischen Separation- (MMS) Chips weisen eine sehr hohe Partitionierungseffizienz auf und können eine sehr geringe Anzahl von Partikeln in großen Puffervolumina unter kontinuierlichem Fluss konzentrieren. Dies ermöglicht die Selektion von Aptameren mit langsamen Dissoziationsraten. Die Verwendung von Carboxylsäure-aktivierten

Einleitung

paramagnetischen Partikeln verhindert zudem die Anreicherung von Matrixbindern, weshalb die Selektion von Aptameren unter Verwendung dieser Methode nur wenige Selektionszyklen erfordert¹¹⁹.

Vollkommen ohne Immobilisierung der Zielmoleküle können Aptamere durch Kapillarelektrophorese selektiert werden. Ebenso wie bei MMS-Chips reduziert sich durch die hohe Partitionierungseffizienz die Anzahl der benötigten SELEX-Zyklen auf zwei bis vier. Das Zielmolekül liegt zudem frei in Lösung vor, weshalb alle potentiellen Bindestellen für Aptamere verfügbar sind. Dem gegenüber stehen allerdings substanzielle Nachteile. Die Trennung von gebundenen Aptameren ist auf größere Zielmoleküle, in der Regel Proteine, beschränkt. Das Probenvolumen liegt im Nanoliterbereich und schränkt dadurch die maximale Diversität der verwendeten Nukleinsäure-Bibliothek stark ein. Auch die Ionenkonzentration im Laufpuffer ist aufgrund der Joule'schen Erwärmung und der daraus resultierenden Bandenverbreiterung eingeschränkt¹²⁰.

Eine Lösung für einige der genannten Probleme bietet die sogenannte Freifluss-Elektrophorese (FFE). Bei dieser Methode findet die Trennung des Analyts unter kontinuierlichem Fluss in einer planaren Flusszelle statt. Im Gegensatz zu anderen Elektrophorese-Verfahren wird das elektrische Feld senkrecht zum druckgetriebenen Probenfluss angelegt und lenkt geladene Moleküle proportional zu ihrer Mobilität lateral ab¹²¹. Auf diesem Weg konnten IgE-spezifische Aptamere mit niedriger nanomolaren Dissoziationskonstante in nur einem SELEX-Zyklus selektiert werden¹²². Die Selektion von Aptameren mit nicht-immobilisiertem Zielprotein scheint insgesamt jedoch keine direkte Verbesserung der Affinität der identifizierten Aptamere gegenüber konventionellen SELEX-Methoden mit sich zu bringen¹²²⁻¹²⁴.

Zelloberflächenproteine, besonders solche, die als klinisch relevanter Marker dienen können, stellen aufgrund ihrer Zugänglichkeit eine prominente Klasse von Zielmolekülen für die SELEX von Aptameren dar. Die Selektion von Aptameren für gereinigte und in aller Regel lösliche Varianten von Zelloberflächenproteinen kann sich jedoch als schwierig erweisen, da das Zielprotein außerhalb seines nativen Milieus vorliegt. Zell-SELEX stellt eine elegante Lösung dieses Problems dar. Die Methode erlaubt die Selektion von Zelltyp-spezifischen Aptameren für Zielstrukturen in ihrem nativen Zustand. Entscheidend für den Erfolg einer Zell-SELEX ist die Gegenselektionsstrategie, für die eine möglichst verwandte Zelllinie verwendet wird. Durch diese Methode lassen sich Aptamere für unbekannte Oberflächenmarker ohne Vorkenntnisse über

Einleitung

deren Natur selektieren¹¹⁴. Alternativ kann zwischen Zell-SELEX und der Selektion für die gereinigte Form eines Oberflächenmarkers alterniert werden. So können Aptamere mit definierter Spezifität für den nativen Marker gewonnen werden. Durch Hochsalz-Waschschritte oder Typisierung der Oberflächenproteine nach Inkubation der Zellen mit der Nukleinsäure-Bibliothek lassen sich zudem spezifisch in die Zelle internalisierende Aptamere selektieren. Auf diese Weise lassen sich Oligonukleotide direkt für den Aptamer-vermittelten Wirkstofftransport anreichern¹²⁵.

Tabelle 1: SELEX-Methoden zur Generierung spezifischer Aptamere

Aptamer	Zielmolekül	Nukleinsäure	SELEX-Methode	Dissoziationskonstante	Ref.
Gp43 RBS ^A major variant	T4 DNA Polymerase	RNA	Filter Retention	4,8 nM	102
B4-25	<i>Reactive Blue 4</i> (Farbstoff)	RNA	Affinitäts- Chromatographie	n.B ^B	103
A10	<i>Prostate specific membrane antigen</i> (PSMA)	2'-F-Py RNA	Paramagnetische Partikel	11,9 nM (Inhibitions- Konstante K_i)	112
Klon 10	Streptavidin	DNA	MMS-Chip ^C	25 nM	119
Pegaptanib [®]	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	2'-F-Py ^D RNA	EMSA ^E	49 pM	126
Klon 4.6	I _g E	DNA	Kapillar- Elektrophorese	27 nM	123
Klon 3.2	I _g E	DNA	Freifluss- Elektrophorese	20 nM	122
TD05	Ramos-Zellen	DNA	Zell-SELEX	74,7 nM	114
A15	Überwindung Blut- Hirn-Schranke (genaues Zielmolekül unbekannt)	2'-F-Py RNA	<i>In vivo</i> -SELEX	n.B. ^B	115

- A. Ribosomen-Bindestelle
- B. Nicht bestimmt
- C. Mikromagnetische Separation
- D. 2'-Fluoro-Pyrimidin
- E. Electrophoretic mobility shift assay

Die SELEX wird in der Regel nach Nachweis der Bindung der Nukleinsäure-Bibliothek an das Zielmolekül beendet. Zwei verschiedene Methoden kommen zum Einsatz, um die individuellen Aptamere der Nukleinsäure-Bibliothek zu identifizieren. Die Klonierung der Bibliothek und anschließende Sanger-Sequenzierung einzelner Klone erlaubt das Analysieren einer begrenzten Stichprobe der vorhandenen Oligonukleotide. Vorteil dieser Vorgehensweise ist die rasche und einfache Durchführbarkeit sowie niedrige Kosten. Die schnelle technische Entwicklung und stark

Einleitung

gesunkenen Kosten, führen jedoch mit zunehmender Häufigkeit zur Nutzung von *Deep-Sequencing* für die Auswertung einer SELEX. Die parallele Sequenzierung vieler Millionen Nukleinsäure-Moleküle ermöglicht die Analyse der Bibliothek bereits nach wenigen Selektionszyklen mit nahezu 100% Abdeckung. Der hohe Durchsatz erlaubt auch die gleichzeitige Sequenzierung verschiedener Selektionszyklen und lässt so Rückschlüsse auf die Anreicherungsraten einzelner Sequenzspezies im Verlauf der SELEX zu¹²⁷.

Nach der Sequenzierung kann die Häufigkeit einzelner Sequenzspezies anhand von *Alignments* bestimmt werden. Algorithmen für die Identifikation von Sequenzmotiven können zudem Gemeinsamkeiten zwischen nicht-verwandten Sequenzfamilien innerhalb der angereicherten Bibliothek aufdecken¹²⁸.

1.7 Aptamer-Modifikationen

Eine der größten Herausforderungen auf dem Weg zu einer breiten Anwendung von Aptameren stellt die Anfälligkeit von Nukleinsäuren gegenüber Nukleasen dar. RNA im Besonderen weist eine sehr kurze Halbwertszeit in biologischen Flüssigkeiten auf und wird bei Kontakt mit Serum in aller Regel binnen Sekunden von RNasen degradiert¹²⁹. Die chemische Modifikation der Zuckergruppe, des Phosphats oder der Base werden zur Lösung dieses Problems eingesetzt. Üblicherweise wird dafür bereits die Ausgangs-Nukleinsäure-Bibliothek entsprechend modifiziert und diese Modifikation in der enzymatischen Produktion der Nukleinsäuren durch Einsatz entsprechender Nukleotid-Analoga während der SELEX aufrechterhalten.

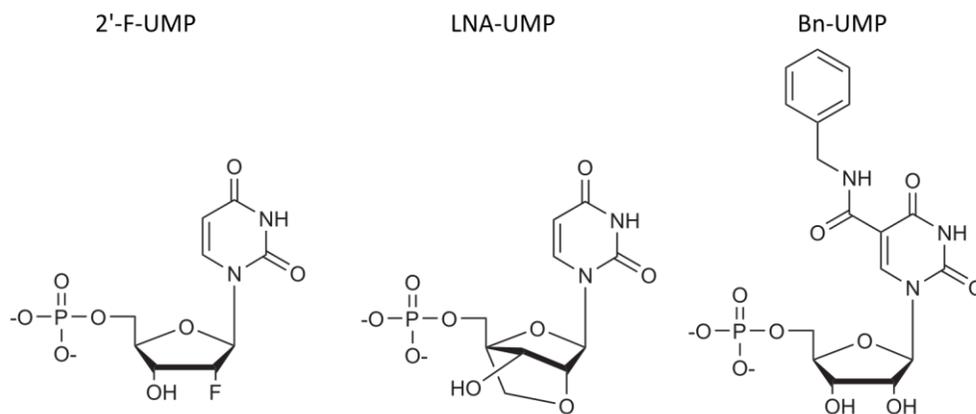


Abbildung 9: Beispiele für modifiziertes Uridinmonophosphat (UMP). 2'-Fluoro-UMP, *Locked nucleic acid* (LNA)-UMP, 5-Benzyl-(Bn)-UMP.

Einleitung

Die Substitution der 2'-OH-Gruppe von RNA durch Fluor (2'-F) oder O-Methyl (2'-O-Me) stellt die wohl am weitesten verbreitete Modifikation für Aptamere dar. Sie führt zu einer signifikant erhöhten Resistenz gegenüber Nuklease-vermittelter Degradation der Aptamere^{130,131}. Alternativ werden sogenannte *Locked nucleic acids* (LNA) mit einer 2'-O-4'-C-Brücke verwendet. Diese erhöhen neben der physiologischen auch die strukturelle Stabilität der Aptamere, indem sie die Ribose in der 3'-endo-Konformation arretieren¹³². Gegenüber Exonukleasen lässt sich die Stabilität durch die terminale Addition eines 3'-3'-verknüpften Deoxythymidins (3'-3'-dT) steigern. Enantiomere (L-RNA) der natürlichen Nukleinsäuren werden für die Selektion sogenannter Spiegelmerer verwendet, die aufgrund der hohen Stereoselektivität von Nukleasen gegenüber enzymatischem Abbau sehr resistent sind. Ihre Selektion erfolgt durch die SELEX mit einer unmodifizierten Nukleinsäure-Bibliothek für ein L-Peptid des entsprechenden Zielproteins. Nach Identifikation der Aptamere kann die L-Form des Aptamers eingesetzt werden, um die entsprechende D-Form des Zielproteins zu binden^{133,134}.

Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts werden Aptamere für den Einsatz *in vivo* darüber hinaus mit einer 5'-Polyethylenglycol-Gruppe ausgestattet. Dies steigert ihre renale Retention, wodurch die Aptamere länger im Blut zirkulieren können¹³⁵.

Gegenüber von Modifikationen, die primär die Stabilität von Aptameren steigern, lässt sich durch Verwendung modifizierter Nukleotide auch das Spektrum möglicher chemischer Interaktionen von Nukleinsäuren erweitern. Durch Kopplung lipophiler, aminosäureähnlicher Reste an die 5-Position von Uridinen lassen sich Aptamere selektieren, die auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit ihrem Zielprotein interagieren. Dadurch ist es gelungen, Aptamere für Proteine zu selektieren, die für konventionelle Nukleinsäuren aufgrund starker negativer Nettoladung, wenig definierter Struktur motive oder hohem Glykosylierungsgrades schwer bis gar nicht zugänglich sind¹³⁶.

1.8 Medizinische Anwendungen für Aptamere

2004 wurde Pegaptanib® als erstes Aptamer durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zugelassen¹³⁷. Pegaptanib bindet alle Isoformen¹³⁷ von humanem VEGF, mit Ausnahme der kleinsten, und verhindert so dessen Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor bei einer IC₅₀ von 49

Einleitung

pM¹³⁸. Durch die Blockierung von VEGF wird die Neovaskularisierung im Auge und die daraus folgende Erblindung aufgehalten¹³⁹. Das Aptamer wurde unter Verwendung einer 2'-F-pyrimidin-(2'-F-Py)-modifizierten RNA-Bibliothek selektiert, auf 27 nt verkürzt und 12 der 14 Purine durch 2'-O-Me-purine (2'-O-Me-Pu) ersetzt¹²⁶. Der 5'-Terminus wurde mit einem 40 kDa PEG zur verbesserten Geweberetention und der 3'-Terminus mit einem 3'-3'-dT zur verbesserten Stabilität gegen Exonukleasen versehen. In Versuchen an Affen konnte aktives Pegaptanib noch 28 Tage nach Injektion nachgewiesen werden¹³⁹.

REG1 beinhaltet das 34 nt 2'-F-Py Aptamer RB006, das den Gerinnungsfaktor IXa mit einem K_d von 2,8 nM bindet, und ein revers-komplementäres 17 nt 2'-O-Met Oligonukleotid, das als Antidot fungiert (RB007). Das Aptamer kann als schnell wirkender Gerinnungshemmer appliziert werden, dessen Wirkung durch Verabreichen von RB007 rasch wieder neutralisiert wird. Die Wirksamkeit des Aptamers konnte bereits in klinischen Studien demonstriert werden¹⁴⁰.

Ebenfalls erfolgreich verliefen die klinischen Studien der Phase II zum CXCL12-bindenden Spiegelmer NOX-A12¹⁴¹. Das Chemokin CXCL12 hat vielfältige Funktionen und ist beteiligt an Zell-*Homing*, Metastasierung, Angiogenese und Gewebereparatur. NOX-A12 blockiert CXCL12 mit einem IC_{50} von ca. 300 pM und interferiert so mit der Motilität von chronisch-lymphatischer-Leukämie- (CLL)-Zellen¹³⁸. Zudem erhöht das Aptamer die Sensitivität der CLL-Zellen gegenüber cytotoxischen Medikamenten und eignet sich deshalb besonders für den kombinatorischen Einsatz mit Chemotherapeutika oder krebszellspezifischen Zytotoxinen¹⁴¹.

Tabelle 2: Aptamere in klinischen Studien, Stand August 2014, übernommen aus Sunet *al.*¹⁰⁹

Aptamer	Zielmolekül	Firma	Medizinische Indikation	Status
ARC 1779	Aktivierter Von-Willebrand-Faktor	Archemix Corporation	Purpura; TTP ^B , Willebrand-Jürgens-Syndrom;	Phase 2 Ab. ^A
ARC 1905	Komplementfaktor C5	Ophthotech Corporation	AMD ^C	Phase 1 Ab.
AS1411	Nucleolin	Antisoma Research	Leukämie	Phase 2 Ab.
E10030	PDGF ^D	Ophthotech Corporation	AMD ^C	Phase 3
NOX-E36	CCL2	NOXXON Pharma AG	Diabetes Mellitus Typ 2	Phase 2 Ab.
NOX-A12	CXCL12	NOXXON Pharma AG	Multiples Myelom; CLL ^E	Phase 2
NOX-H94	Hepcidin	NOXXON Pharma AG	Anämie bei chronischen Erkrankungen	Phase II Ab.
REG1	Gerinnungsfaktor IX	Regado Biosciences	Koronare Herzkrankheit	Phase III

A. Abgeschlossen

B. Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

C. Altersbedingte Makuladegeneration

Einleitung

- D. *Platelet-derived growth factor*
- E. chronische lymphatische Leukämie

Die genannten Beispiele demonstrieren die Wirksamkeit von Aptameren als Therapeutika. Das besondere Potential von Aptamer-basierten Medikamenten liegt jedoch in der weitreichenden und leicht durchführbaren Modifizierbarkeit von Nukleinsäuren. Im Speziellen die Kombination von Aptameren und siRNAs könnte aufgrund der synergetischen Effekte dieser sogenannten Chimären, der Aptamer-vermittelten Spezifität für Zielzellen zum einen und dem siRNA-vermittelten *Knock-down* von krankheitsspezifischen Transkripten zum anderen, neue Behandlungsmöglichkeiten für die personalisierte Medizin bieten.

Für einen umfassenden Überblick der Möglichkeiten, Aptamere für die gezielte Therapie, im Besonderen von Krebserkrankungen, zu funktionalisieren, wird auf Kruspe *et al.* verwiesen¹³⁰. Beispielhaft soll das PSMA-Aptamer und dessen Einsatz im Krebsmodell vorgestellt werden.

Das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) ist ein Membranprotein, das in hohem Maße mit Prostatakrebs und neovaskulärem Gewebe von festen Tumoren assoziiert ist. In der gesunden Prostata ist die Expression des Gens auf eine Splice-Form von PSMA (PSM') ohne Transmembrandomäne beschränkt. Dies macht PSMA zu einem ausgezeichneten Marker für maligne Prostatazellen¹⁴². In einer SELEX für die extrazelluläre Region von PSMA (xPSM) mit einer 2'-F-Py-RNA-Bibliothek konnten zwei Aptamere, A9 und A10, identifiziert werden, die spezifisch an PSMA binden und zusammen mit dem Oberflächenmarker von PSMA-exprimierenden Zellen internalisiert werden^{112,143}. Diese Eigenschaft erlaubte es, durch ein funktionalisiertes Aptamer Wirkstoffe PSMA-vermittelt und somit spezifisch ins Cytoplasma von Krebszellen einzubringen. Hervorzuheben ist hier eine *in vivo*-Studie im Mausmodell, in der eine Chimäre bestehend aus A10 und einer gegen das Transkript des *Polo like kinase 1*-(*Plk1*)-Gens gerichteten siRNA eingesetzt wurde. Verarmung von *Plk1*-Transkript in Krebszellen führt zum G2/M-Arrest, verringerter Proliferation und schließlich dem Zelltod. Nach 10 Tagen täglicher, systemischer Injektion der PSMA-Aptamer-Chimäre konnte in 70% der untersuchten Mäuse eine vollständige Regression des Tumors beobachtet werden¹⁴⁴.

1.9 Aptamer-vermittelte Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion

Eine mögliche Anwendung für IL-6R D3 spezifische Aptamere wäre die Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion.

Die Präferenz von Nukleinsäuren für bestimmte Aminosäuren wie Arginin und Lysin in Kombination mit deren Zugänglichkeit auf der Proteinoberfläche grenzt die für Aptamer-Bindung geeigneten Regionen auf Proteinoberflächen jedoch stark ein. Zusammen mit der Konkurrenz der Aptamere untereinander um Ressourcen in den Amplifikationsschritten resultieren diese Faktoren in der Dominanz von Aptameren für eine oder sehr wenige Strukturelemente auf der Oberfläche des Zielproteins^{136,145,146}.

Es existieren verschiedene Ansätze für die Selektion von Aptameren für nicht dominante Zielregionen. Eine erfolgreich angewendete Möglichkeit ist die Blockierung des präferierten Epitops mit einem bereits selektierten Aptamer^{108,145,146}. Dieses maskiert die präferierte Bindestelle auf der Oberfläche des Zielmoleküls, ohne jedoch selbst durch die verwendeten Primer amplifiziert zu werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung einer einzelnen, alternativen Domäne des Zielproteins dar

Im Falle dieser Arbeit sollten Aptamere für die Domäne 3 des IL-6R selektiert werden. Diese ist nicht identisch mit der Zieldomäne bisher selektierter Aptamere für den IL-6R und dementsprechend ein vielversprechendes Ziel für die Selektion von Aptameren mit alternativer Bindestelle. Darüber hinaus ist Domäne 3 direkt an der Interaktion mit dem Liganden des IL-6R, IL-6, und dem Co-Rezeptor, gp130, beteiligt^{13,15}.

Da bereits für den sIL-6R selektierte Aptamere keinen Einfluss auf die IL-6-abhängige Signaltransduktion ausübten, sollte überprüft werden ob IL-6R D3-spezifische Aptamere den IL-6R für seinen Liganden oder den Co-Rezeptor blockieren können.

2 Zielsetzung

Das Zytokin Interleukin-6 wirkt pleiotrop auf eine große Anzahl immunologischer und homöostatischer Prozesse. Es beeinflusst die Hämatopoese, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, B-Zelldifferenzierung sowie Akkumulation von neutrophilen Granulocyten zu Infektions- und Traumapositionen durch Kontrolle der Granulopoese. Es ist jedoch vor allem die zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen, die das große wissenschaftliche Interesse an diesem Zytokin erklärt. Dereguliertes IL-6 ist ein zentraler Faktor in der Etablierung und Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungen und damit assoziierten Krankheiten^{12,54-60}. Der klinische Erfolg IL-6R-blockierender Proteine wie Tocilizumab und sgp130Fc zeigt das große Potential spezifischer Liganden für den Cytokinrezeptor in klinischen Anwendungen^{83,94,95}.

Ziel dieser Arbeit war die Selektion von hochaffinen und spezifischen IL-6R-D3-bindenden Aptameren. Im Anschluss an die Selektion sollten die Aptamere und ihre Wechselwirkung mit dem IL-6R umfassend charakterisiert werden. Dies schließt die Analyse der Bindung an die lösliche Form des IL-6R, die Bestimmung der Dissoziationskonstanten sowie das Potential, den Rezeptor zu blockieren, mit ein. Auf die Verkürzung eines geeigneten Aptamers folgend sollten strukturelle Untersuchungen Aufschluss über dessen Faltung erbringen. Versuche mit IL-6R-präsentierenden BaF3-Zellen sollten Aufschluss erbringen über die Fähigkeit der Aptamere, den Rezeptor in seiner membrangebundenen Form zu binden. Schließlich sollte durch postselektive Modifikationen eines geeigneten Aptamers dessen Resistenz gegenüber Nukleasen erhöht werden und dieses so für weiterführende Experimente unter Zellkulturbedingungen vorbereiten.

3 Material

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Standard-Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Karl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) in p.A.- Qualität erworben.

Material

3.2 Puffer, Medien und Lösungen

3.2.1 Puffer und Lösungen zu Analyse von Nukleinsäuren.

Puffer	Zusammensetzung
Aminohexansäure-Puffer	20% Methanol; 40 mM Aminohexansäure (C ₆ H ₁₃ NO ₂)
Ammoniumpersulfat	10% (w/v) APS in aqua dest
DNA Gel <i>LoadingDye</i> (LD, DNA-Ladepuffer, 6x)	Hersteller Life Technologies (Darmstadt)
RNA-Elutionspuffer 1	0,3 M CH ₃ COONa; pH 5,2
RNA-Elutionspuffer 2	0,3 M CH ₃ COOLi; pH 5,2
RNA <i>loading dye</i> (Ladepuffer; 2 x)	95% Formamid; 0,025% (w/v) SDS; 0,025% (w/v) Bromphenolblau; 0,025% (w/v) Xylencyanol FF; 0,025% (w/v) Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA
TAE (50x)	2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7,8
Transkriptionspuffer (3x)	40 mM Tris-HCl (pH 8,1), 2 mM Spermidin, 5 mM DTT, 0,01% Triton X-100, 1,5% PEG 6000

3.2.2 Puffer und Lösungen zu Selektion von Aptameren

Puffer	Zusammensetzung
Dynabeads-Kopplungspuffer (PBS/BSA)	1x PBS; 1 µg BSA/µl; pH 7,4
Dynabeads-Lagerungspuffer	1x PBS; 1,25 µg BSA/µl; pH 7,4
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 65 mM Na ₂ HPO ₄ ; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
SELEX-Inkubationspuffer	1x PBS; 3 mM MgCl ₂ ; 1 µg BSA/µl; pH 7,4
SELEX-Puffer	1x PBS; 3 mM MgCl ₂ ; pH 7,4

Material

3.2.3 Puffer und Lösungen zu Analyse von Proteinen

Puffer	Zusammensetzung
BCIP-Lösung (10 x)	0,5% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) in DMF
Biotinylierungsreagenz	10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) CoomassieBrillant Blue G-250; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
DotBlot - AK-Puffer	2,5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS
DotBlot - AP-Substratlösung	1x NBT; 1x BCIP in Dot Blot Reaktionspuffer
DotBlot - Blockpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS
DotBlot - Reaktionspuffer	100 mM Tris; pH 9,5; 4 mM MgCl ₂
NBT-Lösung (10 x)	0,1% (w/v) NBT
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (1x)	0,125 M Tris; pH 8,3; 0,96 M Glycin; 0,5% (w/v) SDS
SDS-Proteinladepuffer (2x)	125 mM Tris-HCl; pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,002% (w/v) Bromphenolblau; 4 mM DTT
Silberfärbung – Entwicklerlösung	625 mg Na ₂ CO ₃ in 25 mL ddH ₂ O, direkte Zugabe von 7,5 µL Formaldehyd (37%)
Silberfärbung – Färbelösung	25 mg AgNO ₃ in 25 mL ddH ₂ O, direkte Zugabe von 7,5 µL Formaldehyd (37%)
Silberfärbung – Fixierlösung	30% (v/v) Ethanol, 15% (v/v) Eisessig in ddH ₂ O
Silberfärbung – Inkubationslösung	0,5 M Natriumacetat-Lösung, 25% (v/v) Ethanol, Zugabe von 50 mg NaS ₂ O ₃ und 125 µL Glutardialdehyd (25%) auf 25 mL dieser Lösung

Material

Silberfärbung – Stopp-Lösung	50 mM Na ₂ EDTA-Lösung
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS

3.2.4 Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

Puffer	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung	20 mg Ampicillin pro ddH ₂ O.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose (4,5 g/L), + L-Glutamin	Hersteller: PAA Laboratories (Marburg)
FKS	Hersteller: PAA Laboratories (Marburg)
LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton pro 1 Liter dH ₂ O
LB-Agar	2,5% (w/v) LB-Medium, 1,5% (w/v) Agar
Pen/Strep (100x)	6,25 mg Penicillin G Natriumsalz/mL; 10 mg Streptomycin/mL; 9 mg NaCl/mL ddH ₂ O
SOC-Medium	10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt

3.3 Nukleinsäure- und Proteinstandards

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific (Braunschweig)
O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific (Braunschweig)
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	Thermo Scientific (Braunschweig)

3.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
HiYield® Plasmid Mini Kit	Süd-Laborbedarf (Gauting)
HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Süd-Laborbedarf (Gauting)

Material

P200 ScreenTape System

Agilent (Waldbronn)

3.5 Nukleotide und Radionukleotide

Bezeichnung	Hersteller
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roth (Karlsruhe)
Ribonukleotidtriphosphate (NTPs)	Roth (Karlsruhe)
2'-Deoxy-2'-fluoro-CTP	Metkinen (Kuopio, Finnland)
2'-Deoxy-2'-fluoro-UTP	Metkinen (Kuopio, Finnland)
[γ - ³² P]-ATP (3,000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic (Braunschweig)

3.6 Allgemeine Materialien zur Aptamer-Selektion

Bezeichnung	Hersteller
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Life Technologies (Darmstadt)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific (Braunschweig)

3.7 Nukleinsäuremoleküle

3.7.1 Vektor

Für die T/A-Klonierung der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek wurde die pUC19-(Life Technologies)-Variante pUC19-T verwendet. Die Karte des vollständigen Vektors ist im Anhang (Abbildung 47) hinterlegt.

Material

3.7.2 DNA-Oligonukleotide:

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden in entsalzter Form von der Firma Metabion (Planegg) bezogen. Revers-komplementäre Template sind in ihrer Bezeichnung durch „rev“ gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'-Richtung
R1 Nukleinsäure-Bibliothek	AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATTCT-N60-CTTCTGGAGTTGACGTTGCT
T7-Primer	AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATT
T7-Primer GG	AATGCTAATACGACTCACTATAGG
RT-Primer	AAGCAACGTCAACTCCAGAAG
F4 Stamm <i>Leader</i> (SL) rev.	CCAATCGCTTAACACCATCCACCCTCCACTCCCACAGCGCCAAACGATGGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCATT
F4 Stamm <i>Leader</i> Kurz (SKL) V1 rev	AGAACCATCCACCCTCCACTCCCACAGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGATCGTATTAGCATT
F4 Stamm <i>Leader</i> Kurz (SKL) V2 rev	AGAACCATCCACCCTCCACTCCCATGGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGATCGTATTAGCATT
F4 Stamm Kurz (SK) V1 rev (RAID3 rev)	AGAACCATCCACCCTCCACTCCCACAGTTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCATT
F4 Stamm Kurz (SK) V2 rev (RAID3 U9C/G10A rev)	AGAACCATCCACCCTCCACTCCCATGGTTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCATT

Material

3.7.3 RNA-Oligonukleotide:

Die verwendeten RNA-Oligonukleotide wurden in HPLC-gereinigter Form von der Firma Biomers (Ulm) oder IBA Life Sciences (Göttingen) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'-Richtung
F4 SK V1 (RAID3)	GGGAGAACUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUUCU
RAID3s	CUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGG
AIR-3A	GGGGAGGCUGUGGUGAGGG
AIR-1A	GGGGUGGCUGUGGUGUGGG
RAID3-Atto 647N	Atto647N-C ₆ H ₁₂ -GGGAGAACUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUUCU
AIR-3A-Atto 647N	Atto647N-C ₆ H ₁₂ -GGGGAGGCUGUGGUGAGGG
Single stranded control (ssc) RNA-Atto647N	Atto647N-C ₆ H ₁₂ -AAGGCUUAGAACGGGAAGCUUU

3.8 Verwendete Proteine

3.8.1 Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DreamTaq™	Thermo Scientific (Braunschweig)
ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich
FastAP	Thermo Scientific (Braunschweig)
Klenow-Fragment	Thermo Scientific (Braunschweig)
SuperScript III™ Reverse Transcriptase (RNase H ⁻)	Life Technologies
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific (Braunschweig)
T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK)	Thermo Scientific (Braunschweig)
T7 RNA-Polymerase	AG-Hahn

Material

T7 RNA-Polymerase Y639F	AG-Hahn
Xcml	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

3.8.2 Weitere verwendete Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Humanes Interleukin-6	Biochrom (Berlin)
Humaner Interleukin-6-Rezeptor	Conaris (Kiel)
Humane Interleukin-6-Rezeptor Domäne 3	Wurde freundlicher Weise von Dr. Inken Lorenzen (Universität Kiel) bereitgestellt. Die Herstellung erfolgte nach Özbek <i>et al.</i> ¹⁵
Humanes Hyper-IL-6	Conaris (Kiel)
Humanes sgp130Fc	Conaris (Kiel)
Streptavidin	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

3.9 Bakterienstamm

E. coli TOP10 (Life Technologies)

Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 *DlacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galUgalK*rpsL (StrR) *endA1 nupG*

3.10 Zelllinien

Die murinen Prä-B-Zelllinien BaF3/gp130/IL-6R/TNF und BaF3/gp130 wurden freundlicherweise von Dr. Athena Chalaris (Institut für Biochemie, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel) bereitgestellt.

Material

3.11 Verwendete Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
FACSAria™ III	BD Biosciences (Heidelberg)
Jasco J-815 CD Spektrometer	Jasco Labor- u. Datentechnik (Groß-Umstadt)
kLSM 510 ConfoCor2	Zeiss (Jena)
Magna-Sep™ MagneticParticle Separator	Life Technologies (Darmstadt)
Minifold® I Dot-Blot-System	Schleicher &Schuell (Dassel)
MolecularImager® VersaDoc™	Bio-Rad (München)
Monolith™ NT.115	NanoTemper Technologies (München)
NanoDrop® ND-1000	PeqLab (Erlangen)
Personal MolecularImager FX, Phosphorimager	Bio-Rad (München)
Sterile Arbeitsbank für die Zellkultur	Thermo Scientific (Braunschweig)
2200 TapeStation	Agilent (Waldbronn)

3.12 weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
QuixSep® Mikrodialysekapsel 0,5 mL	Membrane Filtration Products (Seguin, USA)
Spectra/Por Dialysemembran 3,5 kDa	Spectrum (Frankfurt)

3.13 verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
ChemDraw Pro 11.0	PerkinElmer (Rodgau)
ConfoCor 2 4.0	Zeiss (Jena)
EditSeq (DNASStar) 4.0	Lasergene (Madison, USA)
FACSDiva 6.1.3	Becton& Dickinson (Heidelberg)
Image Lab 5.1	Bio-Rad(München)
Inkscape 0.48	Inkscape Community (Open source)
MegAlign (DNASStar) 4.0	Lasergene (Madison, USA)
Origin 8.5	OriginLab (Northampton, USA)
Paint.NET 3.3	Rick Brewster
PyMOL APBS plugin	Nathan Andrew Baker
PyMOLMolecular Graphics System 1.5.0.4	Schrödinger, LLC (New York, USA)
Quantity-One 4.6.6	Bio-Rad(München)

4 Methoden

4.1 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

4.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-PAGE analysiert. Die Vorgehensweise für die elektrophoretische Trennung der Proteine entsprach Laemmli *et al.*¹⁴⁷. Die Herstellung der Gele basiert auf der Tetramethylethylendiamin (TEMED) - katalysierten, radikalischen Polymerisation von Acrylamid in wässriger Lösung. Initiiert wird die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS). Im Sammelgel erfolgte die elektrophoretische Fokussierung der Probe, anschließend wurden die Proteine über ein Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend separiert. Es wurden Gele mit folgenden Ausmaßen verwendet: 130 mm x 80 mm x 0,75 mm.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Sammelgels.

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

Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels.

Komponente	Endkonzentration
4x Trenngelpuffer	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	10-15%
TEMED (v/v)	0,1%
APS (w/v)	0,7%

Zunächst wurden die Proben in SDS-Proteinladepuffer (1x Endkonzentration) aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch SDS werden Proteine denaturiert und mit einer annähernd homogen verteilten, negativen Ladung versehen. Die Trennung der Proteine erfolgte deshalb

Methoden

vornehmlich aufgrund ihres Molekulargewichts, da die Eigenladung der Proteine maskiert wird. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde DTT eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V.

4.1.2 Proteintrennung und -Analyse durch P200 *ScreenTape*

Neben klassischer SDS-PAGE wurden Proteine auch über P200 *ScreenTapes* (Agilent, Waldbronn) durch eine 2200 *TapeStation* (Agilent, Waldbronn) analysiert. Für die Probenvorbereitung wurde das Kit für P200 *Screen Tapes* unter Beachtung der Herstellerangaben benutzt. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung der Werkseinstellungen des Instruments.

4.1.3 Proteinnachweis mittels Silberfärbung

Die Reduktion von Protein-gebundenen Silberionen zu elementarem Silber erlaubt den Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen). Nach Abschluss der SDS-PAGE wurde das Gel zunächst für 1 h bei RT oder ü. N bei 4 °C in Fixierlösung inkubiert. Durch die Fixierlösung fallen die Proteine im Gel aus, wodurch ihre Mobilität im Gel stark herabgesetzt wird. Zudem wird das SDS durch die Behandlung aus dem Gel entfernt. Es folgte das dreimalige Waschen der Gele mit ddH₂O für jeweils 5 min. Die Gele wurden anschließend für 2 h in der Inkubationslösung inkubiert und danach wiederum dreimal für je 5 min mit ddH₂O gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Gele für 30 min in Färbelösung inkubiert. Es folgte wiederum ein Waschschriff, worauf die Proteine bis zum Hervortreten der Banden in der Entwicklerlösung inkubiert wurden. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Überführen des Gels in die Stopp-Lösung beendet und das Gel zur Dokumentation gescannt.

4.1.4 Proteinnachweis mittels CoomassieBrilliant Blue

Der Triphenylmethanfarbstoff *CoomassieBrilliant Blue* lagert sich an Proteine an und färbt diese damit unspezifisch an¹⁴⁸. PAA-Gele wurden zunächst für ca. 1 h in der *Coomassie*-Färbelösung und anschließend bis zum deutlichen Hervortreten der Proteinbanden in der *Coomassie*-Entfärbelösung inkubiert.

4.1.5 Biotinylierung von Proteinen

Die IL-6R D3 sollte zur Selektion von Aptameren über Biotin auf der Oberfläche von Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen Partikeln (Dynabeads® M-280 Streptavidin) immobilisiert

Methoden

werden. Sulfo-NHS-LC-Biotin reagiert mit primären Aminogruppen und erlaubt so die kovalente Kopplung von Biotin an Proteine unter Abgang der Sulfo-NHS-Gruppe. Zur Kopplung an die IL-6RD3 wurde eine wässrige 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung hergestellt. Diese Biotinylierungslösung wurde bei dreifachem molarem Überschuss für 15 min bei RT und weiteren 15 min auf Eis mit der IL-6R D3 inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde ü. N. mittels Dialyse (4.1.6) abgetrennt.

4.1.6 Dialyse von Biotinylierungsansätzen

Nach Abschluss der Biotinylierungsreaktion (4.1.5) wurde überschüssiges Reagenz durch Dialyse in einer QuixSep® Mikrodialysekapsel (0,5 mL) über eine Spectra/Por-Dialysemembran (MWCO = 3,5 kDa) entfernt. Die Dialyse erfolgte ü. N. gegen 1x PBS.

4.1.7 DotBlot zum Nachweis biotinylierter Proteine

Die Biotinylierung (4.1.5) der IL-6R D3 wurde durch einen DotBlot nachgewiesen. Eine Probe des Ausgangsproteins sowie Aliquots, die vor und nach der Dialyse der IL-6R D3 entnommen wurden, wurden dafür auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Nach dem Trocknen wurde die Membran in 25 mL Blockpuffer überführt und für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend für 5 min in 1x PBS gewaschen und im Folgenden für 1 h bei RT in AK-Puffer mit 10 µL ExtrAvidin® Alkaline Phosphatase inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zwei weiteren Waschschritten mit 1x PBS und einem Waschschriff mit Reaktionspuffer unterzogen. Abschließend wurde die Membran in 12,5 mL AP-Substratlösung inkubiert. Die Reaktion wurde nach dem Hervortreten der Protein-Spots durch Überführen der Membran in ddH₂O beendet.

4.1.8 Kopplung von biotinylierter IL-6R D3 an Dynabeads® M-280 Streptavidin

Biotinylierte IL-6R D3 wurde auf der Oberfläche von paramagnetischen Partikeln (Dynabeads® M-280 Streptavidin) immobilisiert. Die verwendeten Dynabeads® M-280 Streptavidin wiesen 6-7 x 10⁸ Partikel/mL und 10 mg/mL auf. Durch die kovalent gekoppelten Biotinreste konnte die IL-6R D3 über die starke, nichtkovalente Interaktion von Streptavidin und Biotin auf den Dynabeads® immobilisiert werden.

Methoden

400 mg Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden zunächst 5x mit 500 µL Dynabeads-Kopplungspuffer gewaschen, ohne dass die paramagnetischen Partikel dabei austrockneten. Anschließend wurden die Dynabeads® M-280 Streptavidin in 1 mL Dynabeads-Kopplungspuffer resuspendiert und mit 80 µg dialysierter, biotinylierter IL-6R D3 für 15 min bei 4 °C invertiert. Im Anschluss wurden die paramagnetischen Partikel nochmals 5x mit 500 µL Dynabeads-Kopplungspuffer und 2x mit Dynabeads-Lagerungspuffer gewaschen. Die IL-6R D3 beladenen Dynabeads® wurden dann in 1,5 mL Dynabeads-Lagerungspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

4.2 Analyse und Reinigung von Nukleinsäuren

4.2.1 Native PAGE für dsDNA-Fragmente

Doppelsträngige DNA-Fragmente (dsDNA) wurden mittels nativer PAGE analysiert. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der verwendeten PAA-Gele dargestellt. Die Maße der verwendeten Gele entsprachen: 130 mm x 80 mm x 0,75 mm.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten 10% PAA-Gele.

Komponente	Endkonzentration
TAE	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid19:1 (w/v)	10%
TEMED (v/v)	0,1%
APS (w/v)	0,7%

Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 150 V. Nach Abschluss der PAGE wurde die dsDNA über Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen (4.2.4).

4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Restringierte Plasmide wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in 1% Agarose-Gelen gereinigt. Hierfür wurden 1,5 g Agarose in 150 mL 1x TAE-Puffer aufgenommen und durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid (4 µg/mL Endkonzentration) versetzt und zum Gießen der Gele verwendet. DNA-Proben wurden

Methoden

mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 150 V für 45 min getrennt. Die DNA wurde anschließend mittels Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen (4.2.4). Die Banden der geschnittenen Plasmid-DNA wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA durch das HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Süd-Laborbedarf, Gauting) nach Herstellerangaben isoliert (4.2.11).

4.2.3 Denaturierende PAGE

Sowohl Analyse als auch Reinigung von RNA und ssDNA erfolgte durch denaturierende PAGE. Hierfür wurden 10%ige denaturierende PAA-Gele mit 8 M Harnstoff verwendet. Die Zusammensetzung der Gele entsprach, vom zusätzlichen Harnstoff abgesehen, der der nativen Gele (Tabelle 5). Die Gele wurden zunächst für 15 min bei 150 V vorlaufen gelassen. Die Nukleinsäuren wurden vor Beladung des Gels mit 2x RNA-LD gleichen Volumens versetzt und für 2 min bei 80 °C denaturiert. Die Taschen des Gels wurden zunächst gründlich gespült und anschließend mit den Nukleinsäuren beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150-200 V. Der Nukleinsäurenachweis erfolgte für analytische Gele mittels Ethidiumbromid (4.2.4) oder autoradiographisch (4.2.6). Präparative Gele wurden via *UV-Shadowing* (4.2.5) oder autoradiographisch (4.2.6) nachgewiesen.

4.2.4 Nukleinsäurenachweis mittels Ethidiumbromid

Die Interkalation des kationischen, heterozyklischen Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in Nukleinsäuren bewirkt eine Verschiebung seines Absorptionsspektrums und erlaubt so den Nachweis von RNA und DNA in PAA- und Agarosegelen. Das Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes bleibt dabei nahezu unverändert, die Fluoreszenzintensität nimmt nach Interkalation jedoch um den Faktor 50-100 zu. Zur Färbung analytischer Gele wurde 1x TAE mit 4 µg/mL Ethidiumbromid verwendet. Die Inkubation erfolgte für 5 - 10 min. Nukleinsäure-Banden konnten unter UV-Licht bei 312 nm Einstrahlungswellenlänge in einem *MolecularImager*® VersaDoc™ (BioRad, München) nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte durch die Software Image Lab (BioRad, München).

4.2.5 Nukleinsäurenachweis mittels UV-Shadowing

Für die präparative Reinigung von Nukleinsäuren wurde das charakteristische Absorptionsmaximum von RNA und DNA bei 260 nm Wellenlänge ausgenutzt. Dies erlaubte den

Methoden

Nachweis von Nukleinsäuren ohne weitere Färbung. Zunächst wurde das präparative Gel im Anschluss an die PAGE zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen und auf einer Kieselgelplatte positioniert. Diese war mit einem Fluoreszenzfarbstoff beschichtet, der Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm absorbiert. Nukleinsäuren absorbieren im PAA-Gel eingestrahltes UV-Licht bei 254 nm werden deshalb durch lokale Fluoreszenzlöschung als dunkle Bereiche sichtbar. Die Bereiche der Banden wurden markiert und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurden die Nukleinsäure-Moleküle durch Diffusionselution (4.2.9) wiedergewonnen.

4.2.6 Nukleinsäurenachweis mittels Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren wurden über Autoradiographie nachgewiesen. PAA-Gele oder Nitrozellulosemembran wurden dafür zunächst zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen und in einer lichtgeschützten Kassette unter einem Phosphorimager-Screen (BioRad, München) exponiert. Die Dauer der Exposition richtet sich nach dem Grad der radioaktiven Markierung und variierte zwischen wenigen Minuten bis hin zu Stunden. Durch einen Phosphorimager (BioRad, München) und die Software ImageLab (BioRad, München) konnten die Nukleinsäuren räumlich aufgelöst nachgewiesen und die Radioaktivität quantifiziert werden.

4.2.7 Nachweis fluoreszenzmarkierter RNA

Fluoreszenzmarkierter RNAs wurde nach analytischer, denaturierender PAGE in einem MolecularImager® VersaDoc™ (BioRad, München) überprüft. Das verwendete Atto 647N wurde durch Anregung unter einer LED (635 nm) und Fluoreszenzdetektion im roten Bereich (695BP55 Filter) im Gel nachgewiesen.

4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren erfolgten photometrisch unter Verwendung eines NanoDrop ND-1000® (PeqLab, Erlangen). Die Messungen beruhen auf der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm durch Nukleinsäuren. Für die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

Methoden

1 OD₂₆₀ $\hat{=}$ 40 ng/ μ L ssRNA

1 OD₂₆₀ $\hat{=}$ 33 ng/ μ L ssDNA

1 OD₂₆₀ $\hat{=}$ 50 ng/ μ L dsDNA

Als Indiz für die Reinheit der Nucleinsäuren wurde das Verhältnis der Absorption bei 260nm zu 280 nm verwendet. Reine RNA weist eine OD_{260/280} = 2 auf.

4.2.9 Diffusionselution zur Rückgewinnung von Nucleinsäuren aus PAA-Gelen

Im Anschluss an die denaturierendePAGE (4.2.3) und den Nachweis durch UV-*Shadowing* (4.2.5) oder Autoradiographie (4.2.6) wurden Nucleinsäuren durch Diffusionselution aus den PAA-Gelen zurückgewonnen. Zunächst wurden die entsprechenden Bereiche des Gels ausgeschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit 400 μ L RNA-Elutionspuffer 1 oder RNA-Elutionspuffer 2 überführt. RNA-Elutionspuffer 2 wurde für die Reinigung von RNAs vor der Analyse über CD-Spektroskopie (4.6.5) verwendet. Für alle anderen Anwendungen, inkl. Arbeiten mit DNA, wurde RNA-Elutionspuffer 1 verwendet. Die Elution der Nucleinsäuren aus den Gelstücken erfolgte für 2h unter ständigem Schütteln bei 50 °C. An die Elution anschließend wurden die Nucleinsäuren mit Ethanol präzipitiert (4.2.10).

4.2.10 Ethanolpräzipitation von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren können in Anwesenheit monovalenter Kationen, für gewöhnlich Na⁺, Li⁺ oder NH₄⁺, und amphiphilen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Propanol aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Aufgrund der geringeren Dielektrizitätskonstante von Ethanol (24,3 bei 25 °C) gegenüber Wasser (80,1 bei 20 °C) bildet das Phosphatrückrad von Nucleinsäuren bei erhöhten Ethanolkonzentrationen ionische Bindungen zu einwertigen Kationen aus, wodurch RNAs und DNAs präzipitiert werden können. Zu diesem Zweck wurden in Lösungen mit Nucleinsäuren zunächst eine Na⁺-Konzentration von 0,3 M eingestellt und die Lösung dann mit 1 μ L einer gesättigten Glycogenlösung (Thermo Scientific, Braunschweig) sowie 2,5x Volumen absolutem Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Lösung 30 s gemischt und die ausgefallenen Nucleinsäuren durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 16.000 g) präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen, das verbleibende Pellet mit 50 μ L 70% Ethanol überschichtet und der Ansatz

Methoden

erneut zentrifugiert (5 min, 4 °C, 16.000 g). Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und die Nucleinsäuren in ddH₂O aufgenommen.

4.2.11 Isolation von DNA aus Agarosen-Gelen

Durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigte DNA (4.2.2) wurde durch das HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Süd-Laborbedarf, Gauting) aus dem Gel isoliert. Die DNA-Isolation und Reinigung erfolgte anhand der Herstellervorschrift.

4.3 *In vitro* Präparation und Modifikation von Nucleinsäuren

4.3.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Molekülen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch Hybridisierung komplementärer, flankierender Primer-Oligonucleotide (Primer) können DNA-Moleküle, katalysiert durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, exponentiell amplifiziert werden. Beispielhaft ist im Folgenden ein PCR-Ansatz mit der *Thermusaquaticus* (Taq) DNA-Polymerase Variante DreamTaq™ aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
DNA-Templat	1-2	Variabel
DreamTaq™ Puffer (10x)	10	1x
dNTP-Mix (25 mM)	2	500 µM
T7-Primer (100 µM)	1	1 µM
RT-Primer (100 µM)	1	1 µM
DreamTaq™ DNA-Polymerase (5 U/µL)	1	0,05 U/µL
ddH ₂ O	ad. 100	

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA-Templat verwendet. Ein PCR-Zyklus gliedert sich für gewöhnlich in drei Teilschritte. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C denaturiert. Durch rasches Abkühlen kommt es zur Hybridisierung der im Überschuss vorliegenden Primer an das DNA-Templat. Die Temperatur für diesen zweiten Schritt richtet sich nach dem Schmelzpunkt der Primer-Templat-Bindung und liegt in der Regel zwischen

Methoden

50-60 °C. Anschließend wird die Temperatur für Templat-abhängige DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase auf 72 °C erhöht.

Im Folgenden ist das Temperaturprogramm für eine PCR unter Verwendung der DreamTaq™ angegeben. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach der Stoffmenge des eingesetzten Templats.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung (initial)	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 4 – 25
Primerhybridisierung	50-60 °C	45 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Elongation (Final)	72 °C	5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Im Anschluss an die PCR wurde die Amplifikation der DNA durch native PAGE (4.2.1) und Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) kontrolliert.

4.3.2 Kolonie-PCR

Die Identifikation positiver, rekombinanter Klone erfolgte durch Kolonie-PCR. Für diese Methode wurden transformierte, monoklonale *E. coli*-Kolonien direkt in einen PCR-Ansatz (4.3.1) überführt. Das in den Bakterien enthaltene Plasmid diente als Templat für die PCR und ließ sich auf diesem Wege auf das Vorhandensein der insertierten Ziel-DNA-Fragmente untersuchen. Die Auswertung der PCR erfolgte über native PAGE (4.2.1) und anschließende Ethidiumbromidfärbung (4.2.4).

4.3.3 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription erlaubt die RNA-abhängige Biosynthese komplementärer DNA-Moleküle (cDNA), die dann durch PCR amplifiziert werden können. Durch diese Methode konnten nach dem Aptamer-Selektionsschritt eluierte RNA-Moleküle der Nukleinsäure-Bibliothek (3.7.2) zunächst in cDNA umgeschrieben und dann vervielfältigt werden. Für die Katalyse der cDNA-Synthese wurde das Enzym SuperScript™ III Reverse Transkriptase, eine kommerziell erhältliche RNA-abhängige DNA-Polymerase-Variante aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus, verwendet. Diese zeichnet sich durch fehlende RNaseH-Aktivität und erhöhte Thermostabilität aus und

Methoden

erlaubte deshalb die cDNA Synthese bei relativ hohen Temperaturen. Die Komponenten eines RT-PCR-Ansatzes sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der RT-PCR-Ansätze zur RNA-abhängigen DNA-Synthese und Amplifikation

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
Eluierte RNA	50	
DreamTaq™ Puffer (10x)	10	1x
First-strand Puffer (5x)	4	0,2x
dNTP-Mix (25 mM)	2	500 μM
T7-Primer (100 μM)	1	1 μM
RT-Primer (100 μM)	1	1 μM
DTT (100 mM)	2	2 mM
ddH ₂ O	Ad. 98	

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann rasch auf Eis abgekühlt, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu schwächen und die Hybridisierung des RT-Primers zu ermöglichen. Es folgte die Zugabe von je 1 μL SuperScript™ III Reverse Transkriptase (15 U/ μL) und DreamTaq™ (5 U/ μL). Die RT-PCR erfolgte unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Reverse Transkription	54 °C	15 min	1
Denaturierung (initial)	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 4 – 25
Primerhybridisierung	50-60 °C	45 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Elongation (Final)	72 °C	5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Im Anschluss an die RT-PCR wurde die Amplifikation der DNA durch native PAGE (4.2.1) und Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) kontrolliert.

4.3.4 Klenow-Fragment-abhängige Primerextension

Zur Herstellung der dsDNA-Template verkürzter Aptamer-Varianten wurden revers-komplementäre ssDNA-Template mit dem T7-Primer GG hybridisiert und der Gegenstrang

Methoden

anschließend durch Primerverlängerung aufgefüllt. Hierfür wurde die Templat-DNA zunächst über denaturierende PAGE gereinigt (4.2.1), die ssDNA dann über UV-Shadowing nachgewiesen (4.2.5), aus dem Gel ausgeschnitten und über Diffusionselution (4.2.9) und Ethanolpräzipitation (4.2.10) wiedergewonnen. Anschließend wurde das gereinigte ssDNA-Templat in eine Primerverlängerungsreaktion eingesetzt. Die verwendeten Komponenten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Klenow-Fragment-abhängige Primerextensionsansätze

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
ssDNA-Templat	Variable	1 μM
Klenow-Puffer (10x)	10	1x
T7-Primer GG (100 μM)	2	2 μM
DTT (100 mM)	2	2 mM
ddH ₂ O	Ad. 97	

Die Hybridisierung von Primer und Templat erfolgte unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms.

Reaktionsschritt	Temperatur	Temperaturveränderung	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung (initial)	95 °C		2 min	1
Hybridisierung	95 °C	$\Delta T = -1 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ s}$	30 s	45
Kühlung	4 °C	∞		1

Anschließend wurden 1 μL Klenow Fragment (2 U/ μL) und 2 μL dNTP-Mix (25 mM) in die Reaktion eingesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der Primerextension erfolgte über native PAGE (2.2.1) und anschließende Ethidiumbromidfärbung (2.2.3).

4.3.5 *In vitro* T7-Transkription

Die DNA-Bibliothek Aptamer-Klone und die Template der Aptamer-Varianten verfügten über einen T7-Promoter für die Transkription durch die RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen. In die Reaktion wurde dsDNA als Templat eingesetzt, die entweder durch PCR (4.3.1), RT-PCR, (4.3.3) oder Primerverlängerung (4.3.4) gewonnen worden war. Die eingesetzten Komponenten einer *in vitro*-T7-Transkription sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Methoden

Tabelle 9: Zusammensetzung der T7-abhängigen *in vitro*-Transkription

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
dsDNA-Templat	Variable	<0,1 μ M
Transkriptionspuffer (3x)	33	1x
MgCl ₂ (300 mM)	5	15 mM
NTP-Mix (25 mM)	8	2 mM
DTT (100 mM)	2	2 mM
T7-RNA-Polymerase (150 U/ μ L)	2	3 U/ μ L
ddH ₂ O	ad. 100	

Der Ansatz wurde für 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über denaturierende PAGE (4.2.3) und Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) oder, im Falle präparativer Gele, durch UV-Shadowing (4.2.5) überprüft. Durch PAGE gereinigte RNA wurde durch Diffusionselution (4.2.9) und Ethanolpräzipitation (4.2.10) wiedergewonnen.

4.3.6 *In vitro* T7-Transkription unter Verwendung von 2'-F-Pyrimidinen

Für die *in vitro*-Transkription 2'-F-Pyrimidin-(2'-F-Py)-modifizierter RNA-Moleküle wurde analog zur *in vitro*-T7-Transkription (4.3.5) vorgegangen. Als Polymerase wurde jedoch die T7-Variante Y639F verwendet, die in der Lage ist, 2'-modifizierte Nukleotide in die entstehende RNA zu inkorporieren. Zudem wurden die entsprechenden Pyrimidinanaloga 2'-Desoxy-2'-fluoro-CTP und 2'-Desoxy-2'-fluoro-UTP in die Reaktion eingesetzt. Die eingesetzten Komponenten einer *in vitro*-T7-Transkription mit 2'-F-Py sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Methoden

Tabelle 10: Zusammensetzung der T7-abhängigen in vitro-Transkription mit 2'-F-Py

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
dsDNA-Templat	Variable	<0,1 μM
Transkriptionspuffer (3x)	6,7	1x
MgCl ₂ (300 mM)	1	15 mM
ATP (100 mM)	0,4	2 mM
GTP (100 mM)	0,4	2 mM
2'-Deoxy-2'-Fluoro-CTP (40 mM)	1	2 mM
2'-Deoxy-2'-Fluoro-UTP (40 mM)	1	2 mM
DTT (100 mM)	0,4	2 mM
T7-RNA-Polymerase (150 U/ μL)	2	3 U/ μL
ddH ₂ O	Ad. 20	

Der Ansatz wurde für 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über denaturierende PAGE (4.2.3) und Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) oder im Falle präparativer Gele UV-Shadowing (4.2.5) überprüft. PAGE-gereinigte RNA wurde durch Diffusionselektion (4.2.9) und Ethanolpräzipitation (4.2.10) wiedergewonnen.

4.3.7 Radioaktive Markierung des 5'-Terminus von RNA-Molekülen

Um RNA 5'-terminal durch das radioaktive Phosphorisotop ³²P markieren zu können, musste zunächst das 5'-terminale Triphosphat der RNA entfernt werden. Dieser Schritt erfolgte enzymatisch unter Verwendung einer thermolabilen alkalischen Phosphatase, der CIAP- (*calyintestinealkalinephosphatase*)-Variante FastAP™. Die eingesetzten Komponenten eines Dephosphorylierungsansatzes sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines FastAP™-Ansatzes zur 5'-terminalen RNA-Dephosphorylierung.

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
RNA	Variable	2 μM
FastAP-Puffer (10x)	1	1x
FastAP™ (1 U/ μL)	1	0,1 U/ μL
ddH ₂ O	Ad. 10	

Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C und wurde anschließend für 10 min bei 75 °C gestoppt um die FastAP™ zu inaktivieren. Es folgte die 5'-terminale Markierung durch Übertragung des terminalen Phosphats von γ -[³²P]-ATP auf die RNA; katalysiert durch die T4-Polynukleotidkinase

Methoden

(T4-PNK). Die Reaktion erfolgte durch Addition folgender Komponenten in den Dephosphorylierungsansatz:

Tabelle 12: Zusammensetzung eines PNK-Ansatzes zur 5'-terminalen Markierung von RNA mit ³²P.

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
Dephosphorylierungsansatz	10	
T4-Puffer (10x)	1	1x ^A
T4-PNK (10 U/ μ L)	1	0,5 U/ μ L
γ -[³² P]-ATP (10 μ Ci/ μ l)	2	1 μ Ci/ μ l
ddH ₂ O	Ad. 20	

A: Da die T4-PNK im FastAP-Puffer aktiv ist, wurde insgesamt von einer 1x Pufferkonzentration ausgegangen

Die Reaktion wurde für 1 h inkubiert, anschließend mit Ethanolpräzipitiert (4.2.10) und über ein denaturierendes PAA-Gel gereinigt (4.2.3), um nicht inkorporierte Radionuklide abzutrennen. Der Nachweis der RNA im Gel erfolgte autoradiographisch (4.2.6), die RNA wurde anschließend durch Diffusionselution (4.2.9) und Ethanolpräzipitation (4.2.10) wiedergewonnen.

Nach Reinigung der RNA wurden die Proben über eine denaturierende PAGE (4.2.3) und anschließenden autoradiographischen Nachweis (4.2.6) überprüft.

4.4 *In vitro*-Selektion von RNA-Aptameren für die Domäne 3 des Interleukin-6-Rezeptors

Die Selektion von Interleukin-6-Rezeptor Domäne 3 spezifischen RNA-Aptameren erfolgte unter Verwendung einer bereits über drei SELEX-Zyklen für den sIL-6R angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek. Diese wurde freundlicher Weise von Dr. Cindy Meyer (Howard Hughes Medical Institute, USA) bereitgestellt. Das methodische Vorgehen für die ersten drei SELEX-Zyklen ist in den nachstehenden Quellen angegeben^{149,150}.

Für den ersten SELEX-Zyklus mit IL-6R D3 wurden 200 pmol der angereicherten R1 RNA-Bibliothek verwendet. Diese wurde mit ca. 100 pmol der über Dynabeads® immobilisierten Rezeptordomäne in 100 μ L SELEX-Puffer komplementiert mit 1 mg/mL bovinem Serumalbumin (BSA) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Präzipitation der Dynabeads® während der Inkubation wurde durch regelmäßiges Mischen des Ansatzes verhindert. Durch magnetische Separation wurden nicht-

Methoden

bindende Oligonukleotide aus dem Ansatz entfernt und die Dynabeads® anschließend mit 200 µL SELEX-Puffer gewaschen. Nach Abnahme des Überstands wurden die Dynabeads® in 55 µL ddH₂O aufgenommen und gebundene RNA-Moleküle durch 3 min Inkubation bei 80 °C eluiert. Es folgte die zügige magnetische Separation von Dynabeads® und Überstand, welcher direkt in eine RT-PCR (4.3.3) eingesetzt wurde. Die RT-PCR wurde über native PAGE (4.2.1) und Ethidiumbromidfärbung überprüft (4.2.1) und anschließend als Templat für eine *in vitro*-T7-Transkription (4.3.5) eingesetzt. Für SELEX-Zyklus 4 und 5 wurden 20 µL der *in vitro*-T7-Transkription ohne weitere Reinigungsschritte in einen neuen SELEX-Zyklus eingesetzt. Für alle weiteren SELEX-Zyklen wurde die angereicherte RNA-Bibliothek nach der *in vitro*-Transkription über denaturierende PAGE (4.2.3), UV-Shadowing (4.2.5), Diffusionselution (4.2.9) sowie Ethanolpräzipitation (4.2.10) gereinigt.

Das Volumen des SELEX-Puffers aller Waschschrte der SELEX-Zyklen 4-11 wurde auf 500 µL erhöht, die Anzahl der Waschschrte wurde für jeden weiteren Zyklus sukzessive um je einen gesteigert. Eine Übersicht der SELEX ist in (Tabelle 16) wiedergegeben

4.5 Klonierung der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek

4.5.1 XcmI-Restriktion des Vektors pUC19-T

Die Desoxyribonukleotidyltransferase-Aktivität der Taq-Polymease führt zur 3'-terminalen Addition von Adeninen an das PCR-Produkt. Dies erlaubt die direkte Klonierung der PCR-Produkte der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek in Vektoren mit T-Überhängen. Für die Klonierung wurde der Vektor pUC19-T, eine pUC19-Variante mit zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease XcmI, verwendet. Die XcmI-Schnittstelle war so konstruiert, dass die Restriktion des Vektors in zwei 3'-terminalen T-Überhängen resultierte und so die Klonierung der Nukleinsäure-Bibliothek ohne deren vorherige Restriktion ermöglichte. In Abbildung 10 ist der entsprechende Sequenzabschnitt des pUC19-T dargestellt.

Methoden

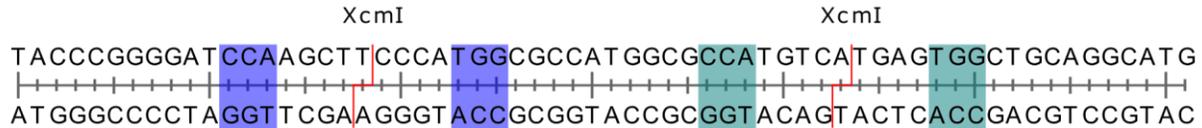


Abbildung 10: Sequenzausschnitt des pUC19-T mit entstehendem XcmI-Restriktionsfragment. Die jeweilige Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease ist in den Kästen dargestellt, die Schnittstelle durch rote Striche gekennzeichnet.

Der Ansatz zur Restriktion der Plasmid-DNA ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13: XcmI-Restriktionsansatz zum Schneiden des pUC19-T-Vektors.

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
pUC19-T	Variabel	60 nM
NEB-Puffer 2 (10x)	2	1x
XcmI (5 U/ μL)	1	0,25 U/ μL
ddH ₂ O	ad. 20	

Die Restriktion wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (4.2.2) getrennt, durch Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) nachgewiesen und anschließend aus dem Gel isoliert (4.2.11).

4.5.2 Ligation des linearisierten pUC19-T und der angereicherten R1 Nukleinsäure-Bibliothek

Die durch RT-PCR (4.3.3) amplifizierte, angereicherte R1 DNA-Bibliothek sollte in den durch XcmI restringierten Vektor pUC19-T (4.5.1) ligiert werden. Für die Ligation wurden ein molares 3:1-Verhältnis von Nukleinsäure-Bibliothek zu Plasmid eingestellt. Die eingesetzten Komponenten der Ligation sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Ansatz zur Ligation von linearisiertem pUC19-T und der angereicherten R1 DNA-Bibliothek.

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
T4 Ligase-Puffer	2	1x
pUC19-T linearisiert	Variabel	3 nM
R1 DNA-Bibliothek	Variabel	9 nM
T4 DNA-Ligase (5 U/ μL)	1	0,25 U/ μL
ddH ₂ O	Ad. 20	

Methoden

Der Ligationsansatz wurde ü.N. bei 16 °C inkubiert und anschließend durch Ethanolpräzipitation (4.2.10) entsalzt.

4.5.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen des Stammes TOP10 (3.9) sollten mittels Elektroporation transformiert werden. Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte nach Dower *et al.*¹⁵¹. Zunächst wurde eine *E. coli*-Vorkultur des TOP10-Stammes in LB-Medium ü.N. bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde eine 400 mL Hauptkultur mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Nach Erreichen der benötigten Zelldichte wurde die Kultur auf Eis überführt und alle folgenden Arbeitsschritte ebenfalls bei 4 °C durchgeführt. Die Kultur wurde in 50 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 1800 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen je 2x mit 50 mL und 2x 25 mL eiskaltem ddH₂O gewaschen, vereinigt und nochmals bei 1800 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurden dann in 2 mL 10% Glycerolresuspendiert und zu je 50 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach dem Aliquotieren wurden die Zellen in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.5.4 Transformation kompetenter *E. coli*

50 µL der kompetenten *E. coli* des Stammes TOP10 (4.5.3) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 µL des pUC19-T/-R1-DNA-Bibliothek-Ligationsansatzes (4.5.2) versetzt. Die *E. coli* wurden in eine auf 4 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 1,8 kV transformiert. Nach der Transformation wurden dem Ansatz 450 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt, und dieser dann in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die transformierten Zellen wurden für 30 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und anschließend auf LB-Platten ausgestrichen. Der LB-Agar wies eine Ampicillin-Konzentration von 100 µg/mL zur Selektion transformierter Klone auf. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne zusätzlich eingesetzte Plasmid-DNA elektroporiert worden waren. Die ausgestrichenen *E. coli* wurden ü. N. in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden monoklonale *E. coli*-Kolonien durch Kolonie-PCR auf die Insertion eines DNA-Moleküls der R1 Nukleinsäure-Bibliothek in den pUC19-T-Vektor überprüft. Positive Kolonien wurden ü. N. in 3 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin inkubiert.

Methoden

4.5.5 Isolation von Plasmid-DNA aus monoklonalen *E. coli*-Kolonien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen des Stamms TOP10 erfolgte unter Verwendung des HiYield® Plasmid Mini Kits (Süd-Laborbedarf, Gauting). Die Präparation des Vektors wurde der Herstellervorschrift entsprechend durchgeführt.

4.5.6 DNA-Sequenzierung der klonierten Nukleinsäure-Bibliothek

Die Sequenzierung der Plasmide, die nach Transformation (4.5.4) von *E. coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz von pUC19-T und der R1 Nukleinsäure-Bibliothek (4.5.2) isoliert wurden (4.5.5), erfolgte durch die Firma GATC (Köln). Als Primer für die Sequenzierung wurde der durch GATC angebotene PCR1-Primer (CGGGCCTCTTCGCTATT) verwendet. Dieser bindet 128 bp stromaufwärts der Insertionsstelle der R1 Nukleinsäure-Bibliothek im pUC19-T.

4.5.7 Bioinformatische Auswertung von DNA-Sequenzierungen

Die Auswertung der Sequenzierung von pUC19-T-Plasmiden mit Klonen der R1 DNA-Bibliothek erfolgte durch Programme des DNASTar-Programmpakets (DNASTar, Madison, USA). Zunächst wurden die Sequenzen durch das Programm EditSeq getrimmt und die Orientierung vereinheitlicht. Nachdem die Sequenzabschnitte des Vektors entfernt worden waren, wurden die durch die konstanten Bereiche der DNA-Bibliothek flankierten Kernregionen durch das Programm Megalign nach Jotun-Hein¹⁵² verglichen. Das *Alignment* wurde zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums verwendet.

4.6 Identifikation und Charakterisierung von Aptameren

4.6.1 Filterretentionsassay (FRA)

Der Bindungsnachweis und die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von RNA-Molekülen an Proteine erfolgte mittels Filterretentionsassay (FRA). 5'-³²P-markierte RNA (4.3.7) wurde für die Bindungsassays bei konstanter Konzentration (<1 nM) mit dem entsprechenden Protein inkubiert. Bindungstests wurden unter Verwendung von *ProteinLoBindTubes* (Eppendorf) durchgeführt, um die Adhäsion der Proben an die Wand der Reaktionsgefäße zu minimieren. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wurden 1:2-Verdünnungsserien des Zielproteins mit den RNA-Oligonukleotiden für 30 min inkubiert. FRA-Analysen der angereicherten RNA-Bibliothek sowie

Methoden

der unverkürzten Aptamer-Kandidaten fanden unter Verwendung von SELEX-Puffer für die Inkubations- und Waschschriffe statt. Bindungstests für Varianten der Sequenz-Familie 4 wurden mit 1x PBS durchgeführt. Alle Bindungstests einzelner Aptamerklone wurden mit 2 µM tRNA durchgeführt, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen zu verringern.

Zunächst wurde eine Nitrozellulosemembran 15 min in Aminohexansäure-Puffer vorbehandelt, dann in eine 96-well-Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) eingespannt und die Wells unter Vakuum zweimal mit 200 µL des entsprechenden Puffers gewaschen. Anschließend wurden die RNA-Protein-Ansätze über die Nitrozellulosemembran filtriert. Während freie RNA-Moleküle die Membran größtenteils passierten, wurden Proteine sowie an diese gebundene RNA durch die Nitrozellulose zurückgehalten. Die Membran wurde dann wiederum zweimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und abschließend getrocknet. Eine konstante Menge der radioaktiv markierten Proben-RNA wurde als Referenz für den Anteil der gebundenen Nukleinsäuren auf die Membran aufgebracht und mittels Autoradiographie (4.2.6) nachgewiesen. Die Berechnung der Dissoziationskonstante erfolgte unter Verwendung der Hill1-Gleichung im Programm Origin (OriginLab, Northampton, USA):

$$y = START + (END - START) * \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

Als START-Wert wurde der Mittelwert der Hintergrundbindung der jeweiligen RNA-Probe festgelegt.

4.6.2 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) basiert auf der Mobilitätsdifferenz Protein-gebundener gegenüber frei vorliegender RNA-Moleküle in einer nativen PAGE. Die Probenvorbereitung für das EMSA verlief analog zum FRA (4.6.1). Die Proben wurden nach der Inkubation mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und über ein native PAGE (4.2.1) getrennt. PAA-Gele, Laufpuffer und Laufkammer wurden auf 4 °C vorgekühlt. Die PAGE erfolgte bei 80 V für 90 min und 4 °C. Die Zusammensetzung der verwendeten PAA-Gele ist in Tabelle 15 angegeben.

Methoden

Tabelle 15: Zusammensetzung nativer Gele für das EMSA.

Komponente	Endkonzentration
TAE	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	3,5%
TEMED (v/v)	0,2%
APS (w/v)	1,5%

Die Auswertung des EMSA erfolgte autoradiographisch (4.2.6).

4.6.3 *Microscale* Thermophorese

Als Thermophorese wird die Bewegung von Molekülen über einen Temperaturgradienten bezeichnet. In der *Microscale* Thermophorese (MST) wird durch einen Laser ein steiler, lokal eng begrenzter Temperaturgradient induziert, anhand dessen sich Moleküle in Lösung bewegen. Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Moleküle erlaubt es, die Ab- oder Zunahme der thermophoretischen Bewegung von Molekülen innerhalb des erhitzten Bereiches zeitaufgelöst zu erfassen. Binden die fluoreszenzmarkierten Moleküle einen Interaktionspartner, so ändern sich ihre Hydrathülle, Masse und Ladung. Dies resultiert in einer Veränderung der thermophoretischen Mobilität und erlaubt so Rückschlüsse auf die Bindungsparameter. Die Probenvorbereitung verlief analog zum FRA (4.6.1), es wurde statt radioaktiv markierter RNA jedoch 5'-Atto 647N-markierte RNA bei einer konstanten Konzentration von 7,5 nM verwendet. Die RNA-Protein-Proben wurden nach Inkubation in Monolith™ NT.115 *standardtreated* Kapillaren durch ein Monolith™ NT.115 (NanoTemper, München) vermessen. Die Auswertung der Messung erfolgte durch die Firma NanoTemper (München).

4.6.4 Charakterisierung der Stabilität modifizierter und nicht-modifizierter RNA-Moleküle

Die Bestimmung der Stabilität von RNA-Molekülen unter Zellkulturbedingungen fand unter Verwendung radioaktiv markierter RNA statt (4.3.7). Diese wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), komplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, 10% v/v in Medium; DMEM/10% FKS), bei 37 °C inkubiert. Nach festen Intervallen wurden 5 µL Aliquots der Lösung abgenommen, zügig in 1 Volumen 2x RNA LD aufgenommen und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C aufbewahrt, durch denaturierende PAGE getrennt und autoradiographisch nachgewiesen (4.2.6).

Methoden

4.6.5 Bestimmung des Circular dichroismus von RNA-Molekülen

Optisch aktive, chirale Moleküle absorbieren zirkular polarisiertes Licht in Abhängigkeit von dessen Drehrichtung unterschiedlich stark. Dieses als Circular dichroismus (CD) bezeichnete Phänomen kann zur Charakterisierung von Strukturelementen in Proteinen und Nucleinsäuren herangezogen werden. Durch *in vitro*-Transkription hergestellte RNA-Moleküle wurden vor der Messung durch präparative, denaturierende PAGE (4.2.3), Diffusionselution (4.2.9) und Ethanolpräzipitation (4.2.10) gereinigt. Diffusionselution und Ethanolpräzipitation fanden Na⁺-frei unter Verwendung von 0,3 M CH₃COOLi, pH 5,2 statt. Kommerzielle bezogene, HPLC-gereinigte RNA-Moleküle wurden keinen weiteren Reinigungsschritten unterzogen und direkt vermessen.

Alle Messungen erfolgten unter Verwendung eines Jasco J-815 CD-Spektrometers (Jasco Labor-u. Datentechnik, Groß-Umstadt). Die RNA-Proben wurden zunächst in 50 mM Tris-Puffer aufgenommen und 10 CD-Spektren im Wellenlängenbereich 200-300 nm bei RT akkumuliert und gemittelt. Die Messung wurde dann unter gleichen Bedingungen in 50 mM Tris komplementiert mit 10 mM KCl wiederholt. Als Basislinie wurden die Puffer ohne zugesetzte Nucleinsäuren vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm Origin (OriginLabs, Northampton, USA).

4.7 Zellbiologische Arbeiten

Zellbiologische Arbeiten fanden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung der verwendeten BaF3-Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre und unter 5% CO₂. Für zellbiologische Arbeiten wurden nur sterile Medien und Puffer verwendet.

4.7.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zellversuche fanden unter Verwendung der murinen Prä-B-Zelllinie BaF3 statt. Es wurden zum einen BaF3-Zellen verwendet, die stabil mit der cDNA des humanen gp130, IL-6R und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (BaF3/gp130/IL-6R/TNF), zum anderen solche die ausschließlich mit humanem gp130 (BaF3/gp130) transfiziert worden waren. Die Zellen wurden in 75 cm²-Flaschen in DMEM/10% FKS komplementiert mit 1x Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert.

Methoden

BaF3 Zellen sind für Proliferation und Wachstum abhängig von STAT5-Tyrosinphosphorylierung¹⁵³. Da diese durch IL-6-abhängige Signaltransduktion gewährleistet werden kann, können BaF3-Zellen in Abhängigkeit des Zytokins, bzw. dessen Fusionsproteinvariante Hyper-IL-6, kultiviert werden. Auf diesem Weg können die Zellen direkt auf Expression und Präsentation der für die IL-6-Signaltransduktion nötigen Proteinkomponenten selektiert werden¹⁵⁴. BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen wurden deshalb zusätzlich mit 10 ng/mL humanem IL-6, BaF3/gp130 mit 10 ng/mL Hyper-II-6 kultiviert.

Die Zelldichte wurde stets unter 500.000 Zellen/mL gehalten und eine Fraktion der Zellen bei Annäherung an diese Schwelle in eine neue 75 cm²-Flasche passagiert, in der frisches DMEM/10% FKS, 1x Pen/Strep und 10 ng/mL des Zytokins vorgelegt worden waren.

4.8 Charakterisierung der Aptamer-Bindung an Zellen

Vor der Untersuchung der RNA-Zell-Interaktion wurden die Zellen zunächst in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 5 min bei RT und 500 *g* zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen dann je einmal in 50 mL und 25 mL 1x PBS komplementiert mit 1 mg/mL BSA (PBS/BSA) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in PBS/BSA aufgenommen, die Zelldichte bestimmt und nach einem letzten Waschschrift eine Zelldichte von 2000 Zellen/ μ L in PBS/BSA eingestellt. Für die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten RNA-Molekülen wurde anschließend eine Zelldichte von 1000 Zellen/ μ L eingestellt. Die Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierter RNA fand, so nicht anders vermerkt, für 30 min bei 37 °C lichtgeschützt in PBS/BSA statt. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit 200 μ L PBS/BSA bei 4 °C gewaschen und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

4.8.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie (kLSM) erlaubt den räumlich aufgelösten Nachweis von fluoreszenzmarkierten Molekülen. Dies wird durch die konfokale Optik des Mikroskops, eine Lochblende im Fokus zweier Linsen, ermöglicht. Das Rastern eines Präparats auf einer definierten Z-Ebene erlaubt Rückschlüsse auf die zelluläre und subzelluläre Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen oder fluoreszenten Markern.

Methoden

BaF3-Zellen wurden wie in 4.8 beschrieben vorbereitet und anschließend mit 500 nM Atto 647N-markierter RNA F4 SK V1 (RAID3) sowie AIR-3A als Positiv- oder *singlestrandedcontrol*- (ssc)-RNA als Negativkontrolle inkubiert (3.7.3). Nach dem Waschen (4.8) wurden die Zellen unter Verwendung eines kLSM 510 ConfoCor2 (Zeiss, Jena) untersucht. Neben der Inkubation bei 37 °C in PBS/BSA wurde die Inkubation für den ausschließlichen Nachweis internalisierter RNA modifiziert. Nach Inkubation in PBS/BSA für 10 min bei 37 °C wurden die Zellen für 5 min bei 500 *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen für 20 min in DMEM/10% FKS inkubiert. Von der Inkubation in Medium abgesehen, wurde wie in 4.8 beschrieben verfahren. Für die konfokale Mikroskopie wurden folgenden Einstellungen des Instruments verwendet: HeNeLaser (633 nm), 5–15% Laserstärke, 260 µm Lochblenden-Durchmesser, Strahlteiler: 9 HFT514/633 nm und NFT 545 nm, LP 650 nm Filter.

4.8.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie erlaubt die schnelle, sequenzielle Analyse von Zellen. Die Zellen werden hierfür in ein Kapillarsystem aufgenommen und durchlaufen hydrodynamisch fokussiert jeweils einzeln eine Messzelle, in der sie nacheinander mehrere Laserstrahlen passieren. Die vorwärts gerichtete Streuung (*forwardscatter*, FSC) des Laserlichts ermöglicht Rückschlüsse auf die Größe der Zellen, die seitwärts gerichtete Streuung (*sidewardscatter*, SSC) auf die Phasenübergänge innerhalb der Zellen. Der SSC korreliert deshalb mit dem Kompartimentalisierungsgrad der Zellen. Neben diesen phänotypischen Parametern kann durch das Laserlicht induzierte Fluoreszenz durch Filter fragmentiert und von Sensoren detektiert werden. Dies erlaubt zum einen den qualitativen Nachweis von Zell-assoziierte Fluoreszenz, zum anderen lassen sich anhand der Daten auch quantitative Aussagen über die Fluoreszenzintensität der Zellen treffen.

Die Vorbereitung der BaF3-Zellen erfolgte wie in 4.8 beschrieben. Neben der Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für weitere Versuche auch abgedunkelt bei RT mit den Atto 647N-markierter RNA inkubiert (3.7.3). Es wurde zudem eine Negativkontrolle ohne zugesetzte RNA zur Ermittlung der Autofluoreszenz der BaF3-Zellen vermessen. Die Konzentration für Atto 647N-markierte RNA während der Inkubation entsprach 200 nM. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung eines FACSAria™ III (Becton& Dickinson, Heidelberg) und der Software FACSDiva Version 6.1.3 (Becton& Dickinson, Heidelberg). Für alle durchgeführten Messungen

Methoden

wurden die Spannung der *photomultipliertubes* (PMT) von FSC, SSC und 660 nm Detektor konstant gehalten um vergleichbare Messwerte zu erhalten.

4.9 Berechnung der Oberflächenladung des IL-6R

Um die elektrostatische Ladung der IL-6R-Oberfläche zu berechnen, wurde zunächst das elektrostatische Kontinuum der IL-6R Struktur durch das webbasierte Programm PDB2PQR^{155,156} unter Verwendung der Standardparameter berechnet. Die PDB-Datei des IL-6R (PDB-id:1N26)¹⁴ wurde hierfür in eine PQR-Datei überführt. Anschließend wurde die Poisson-Boltzman-Gleichung für den IL-6R durch das PyMOL-Plugin „Adaptive Poisson-Boltzmann Solver“ (APBS)¹⁵⁷ gelöst und die Oberflächenladung des IL-6R durch PyMOL grafisch dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Selektion von IL-6R-Domäne-3-spezifischen RNA-Aptameren

Die Selektion von RNA-Aptameren für die Domäne 3 des Interleukin-6-Rezeptors erfolgte unter Verwendung einer bereits vorselektierten R1-RNA-Bibliothek (Abbildung 7, 4.4). Diese wurde freundlicherweise von Frau Dr. Cindy Meyer bereitgestellt und hatte bereits drei SELEX-Zyklen mit immobilisiertem sIL-6R als Zielmolekül durchlaufen. Dadurch sollte die Anreicherung von Aptameren für den nativ gefalteten Rezeptor garantiert werden. Gleichzeitig sollten potentielle Kandidaten mit Affinität für nicht auf der Proteinoberfläche zugängliche Epitope des sIL-6R aus der RNA-Bibliothek entfernt werden.

5.1.1 Biotinylierung von IL-6R Domäne 3

Die Selektion der Aptamere erfolgte über die magnetische Separation von proteingebundenen RNA-Spezies und ungebundenen Oligonukleotiden. Die Domäne 3 des IL-6R sollte deshalb über kovalent gekoppeltes Biotin an Streptavidin-besetzte Dynabeads™ (LifeTechnologies) immobilisiert werden. Die Biotinylierung von IL-6R D3 erfolgte wie in 4.1.5 beschrieben. Biotin wurde hierbei in dreifachem Überschuss zum Protein eingesetzt. Das verwendete Sulfo-NHS-LC-Biotin bildet unter Abgang der Sulfo-NHS-Gruppe eine stabile Amidbindung mit primären Aminogruppen, wie sie am N-Terminus oder bei Lysin-Resten vorliegen. Die verwendete Domäne 3 des IL-6R weist zwei Lysin-Reste auf. Diese sind zusammen mit der terminalen Aminogruppe in Abbildung 11 dargestellt. Die Zugänglichkeit aller Aminogruppen auf der Oberfläche des Proteins sollte gewährleistet sein, um eine homogene Verteilung der IL-6R D3 auf den magnetischen Partikeln zu gewährleisten und insgesamt alle Oberflächenbereiche für die Aptamer-Selektion bereitzustellen. Die Zugänglichkeit aller Oberflächenbereiche des Proteins sollte gewährleistet sein, wenn angenommen wird, dass alle Aminogruppen der IL-6R D3 eine vergleichbare sterische Zugänglichkeit aufweisen.

Ergebnisse

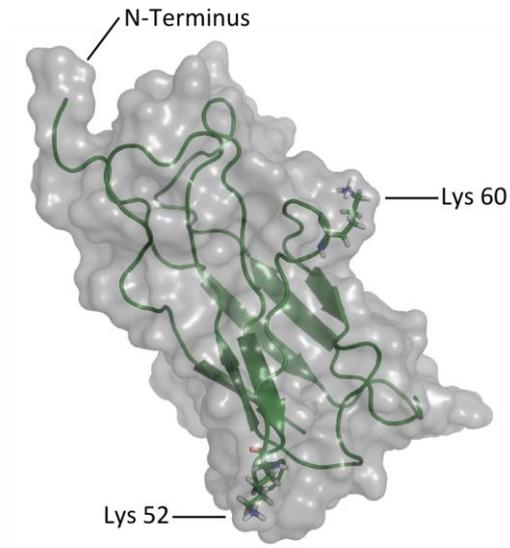


Abbildung 11: NMR-Struktur der Interleukin-6-Rezeptor Domäne 3 (PDB-id: 2ARW¹⁵). Hervorgehoben sind die möglichen Biotinylierungspositionen, die Lysine Lys52 und Lys60 der Fibronectin III-ähnlichen Domäne, sowie der N-Terminus.

Nach der Biotinylierung des Proteins (4.1.5) und anschließender Dialyse (4.1.6) zur Abtrennung überschüssiger Reagenzien wurde eine SDS-PAGE (4.1.1) sowie ein Dot-Blot (4.1.7) durchgeführt (Abbildung 12). In beiden Fällen wurden jeweils Aliquots der unverdünnten IL-6R D3, sowie Proben, die direkt vor und nach der Dialyse entnommen wurden, überprüft. Der Proteinnachweis im Polyacrylamidgel erfolgte über Silberfärbung (4.1.3).

Ergebnisse

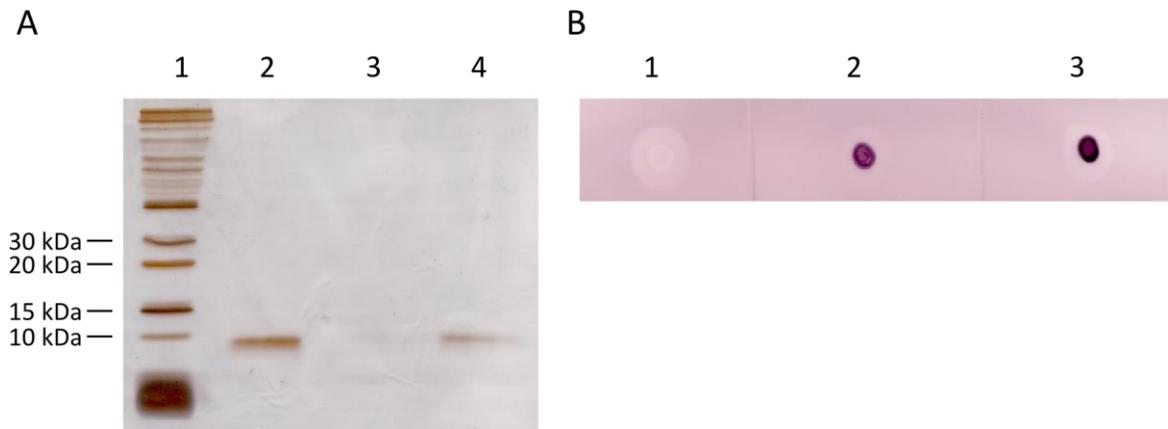


Abbildung 12: Überprüfung der Biotinylierung der IL-6R D3. Die Domäne 3 des IL-6R wurde unter Verwendung von Sulfo-NHS-LC-Biotin an primären Aminogruppen biotinyliert. Nach Abschluss der Reaktion und Abtrennen des überschüssigen Biotins wurde das Ergebnis gelelektrophoretisch und mittels Nachweis durch ExtrAvidin überprüft. Die Überprüfung erfolgte mit je 1 µg unverdünnter Ausgangsprobe sowie je 200 ng Aliquots der IL-6R D3, die direkt nach der Biotinkopplung und nach der Dialyse abgenommen wurden. (A) Silberfärbung der SDS-PAGE der IL-6R D3. 1: PAGERuler Unstained Protein Ladder, 2: IL-6R D3 Ausgangsprobe, 3: IL-6R D3 nach Biotinkopplung, 4: IL-6R D3 nach Dialyse. (B) Dot-Blot der IL-6R D3. 1: IL-6R D3 Ausgangsprobe, 2: IL-6R D3 nach Biotinkopplung, 3: IL-6R D3 nach Dialyse.

Im SDS-PAGE-Gel konnte die Bande auf Höhe von ca. 10 kDa der IL-6R D3 zugeordnet werden (Abbildung 12A). Spur 3 zeigte nur eine schwache Bande für den Biotinylierungsansatz, die Proteinkonzentration nahm im Verlauf der Dialyse durch Abnahme des Probenvolumens in der Dialysekammer jedoch zu (Abbildung 12A, Spur 3 und 4). Der Biotinnachweis über Dot-Blot zeigte die erwarteten Signale für die IL-6R D3 nach Biotinylierung (Abbildung 12B 2) und Dialyse (Abbildung 12B 3). Auch hier lässt sich die Zunahme der Proteinkonzentration im Verlauf der Dialyse nachvollziehen (Abbildung 12B Spot 2 und 3)

Nach erfolgreicher Biotinylierung der IL-6R D3 wurde das Protein wie in 4.1.8 beschrieben auf Dynabeads M-280 Streptavidin immobilisiert.

5.1.2 Selektion von IL-6R D3 spezifischen RNA Aptameren

Im SELEX-Verfahren werden bindende Oligonukleotidspezies durch alternierend durchgeführte Selektions- und Amplifikationsschritte angereichert. Trotz einer großen Vielfalt alternativer Varianten der Methode (Tabelle 1) beruht der Selektionsschritt in der Regel auf der Immobilisierung des Zielmoleküls und der anschließenden Trennung von gebundenen Aptameren

Ergebnisse

und in Lösung befindlicher, nicht bindender Nukleinsäuren. Der Ablauf der SELEX mit an magnetischen Partikeln immobilisiertem Zielmolekül ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die verwendete R1-Nukleinsäure-Bibliothek hatte im Vorfeld bereits drei SELEX-Zyklen (Tabelle 16), durchgeführt von Dr. Cindy Meyer, mit immobilisiertem sIL-6R als Zielmolekül durchlaufen. Die angereicherte Nukleinsäure-Bibliothek lag als RT-PCR-Produkt in Form von dsDNA vor. Es wurde zunächst eine T7-Transkription (4.3.5) durchgeführt und die erzeugte RNA anschließend über denaturierende PAGE gereinigt. Nach Diffusionselektion (4.2.9) und Ethanol Präzipitation (4.2.10) der RNA wurde diese in einer analytischen denaturierenden PAGE überprüft.

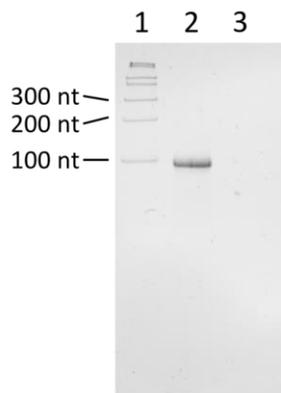


Abbildung 13: Analyse der angereicherten R1 RNA-Bibliothek nach PAGE-Reinigung. Die Selektion von RNA-Aptameren für die IL-6R D3 wurde mit einer bereits durch drei Selektionszyklen für den sIL-6R vorangereicherten R1-Bibliothek durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde von Frau Dr. Cindy Meyer bereitgestellte Templat-DNA für die T7-Transkription verwendet. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Transkriptionsansatz PAGE-gereinigt und 200 ng nach Aufnahme in 20 µL ddH₂O durch eine denaturierende PAGE überprüft. 1: *RiboRuler Low Range RNA Ladder*, 2: R1 RNA-Bibliothek, 3: Negativkontrolle.

200 pmol RNA der angereicherten R1Bibliothek wurden in den ersten SELEX-Zyklus mit IL-6R D3 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in SELEX-Puffer, der mit 1 µg bovinem Serumalbumin (BSA) pro µL Puffer komplementiert wurde, um die Bindung der Beads an die Gefäßwand zu verhindern und Aptamere mit unspezifischer Affinität zu Proteinen abzureichern. Der verwendete 1x PBS pH 7,4 mit 3 mM MgCl₂ sollte die Selektion von Aptameren ermöglichen, die unter physiologischen Ionenkonzentrationen binden. Die vollständige Beschreibung des Selektionsschrittes ist in 4.4 aufgeführt.

SELEX-Experimente zeigen eine starke Tendenz, Aptamere für ein einzelnes Epitop zu erzeugen^{145,146}. Diese Prävalenz konnte auch in vorhergehende Aptamerselektionen für den sIL-

Ergebnisse

6R beobachtet werden¹⁵⁰. Um möglicherweise unterrepräsentierte Oligonukleotide mit Spezifität für die IL-6R D3 nicht zu verlieren, wurde die erste Selektionsrunde nur einem einzelnen Waschschrift mit 200 µL SELEX-Puffer unterzogen. Anschließend wurden die Beads in ddH₂O aufgenommen und gebundene RNAs durch Erhitzen für 3 min bei 80 °C und sofortige magnetische Separation von Beads und Überstand eluiert. Der Überstand wurde im Folgenden in eine RT-PCR (4.3.3) mit 19 PCR Zyklen eingesetzt und anschließend über eine native PAGE (4.2.1) ausgewertet.

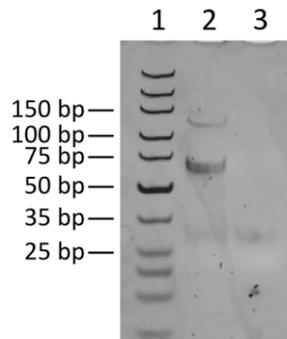


Abbildung 14: Native PAGE der RT-PCR nach Selektionszyklus 1 mit IL-6R D3 (Selektionszyklus 4 insgesamt). Die RT-PCR der R1-RNA-Bibliothek nach Abschluss des ersten SELEX-Zyklus wurde über eine native PAGE ausgewertet. 2 µL der DNA-Probe sowie 2 µL der Negativkontrolle wurden zu diesem Zweck eingesetzt. 1: *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*, 2: RT-PCR der R1-Bibliothek, 3: Negativkontrolle.

Neben der erwarteten Bande mit einer Größe von 128 bp wurde eine zweite dominante Bande bei ca. 65-70 bp in der Auswertung der RT-PCR beobachtet. Da diese Bande in der Negativkontrolle nicht vorhanden war, wurde eine Templatabhängigkeit dieses PCR-Artefaktes angenommen. Da diese verkürzten PCR-Produkte primerabhängig auch über einen T7-Promotor verfügen und deshalb sowohl in der enzymatischen Vervielfältigung der DNA als auch der RNA-Erzeugung mit der eigentlichen Bibliothek konkurrieren würde, wurden die Produkte der T7-Transkription in der SELEX nach jedem Zyklus, bis auf 5 und 6, PAGE-gereinigt.

Durch die Sequenzierung des ca. 65-70 bp RT-PCR-Artefakts (Abbildung 14) konnte die Hypothese einer Deletion innerhalb der Kernregion bestätigt werden. Die Sequenz des PCR-Artefaktes entsprach einer Fusion der verwendeten Primer, die 60 bp Kernregion fehlte vollständig. Für den weiteren Verlauf der SELEX wurde das Puffervolumen für die Waschschriffe auf 500 µL SELEX-Puffer erhöht und die Anzahl der Waschschriffe mit jedem weiteren Selektionszyklus sukzessive um je einen erhöht. Die Anzahl der notwendigen PCR-Zyklen nach der reversen Transkription

Ergebnisse

wurde konservativ anhand des vorhergehenden Selektionszyklus geschätzt und nach der Analyse durch native PAGE bei Bedarf weitere Zyklen addiert.

Tabelle 16: Verlauf der SELEX unter Aufführung der wichtigsten Parameter.

SELEX-Zyklus	Eingesetzte RNA	Waschschritte	PCR-Zyklen
1-3 *			
4	200 pmol	1x 200 µL	19
5	20 µL T7 Ansatz	2x 500 µL	19
6	20 µL T7 Ansatz	3x 500 µL	18
7	100 pmol	4x 500 µL	12
8	100 pmol	5x 500 µL	8
9	100 pmol	6x 500 µL	7
10	100 pmol	7x 500 µL	5
11	100 pmol	8x 500 µL	4

* Die Selektionszyklen 1-3 wurden unter Verwendung des sIL-6R von Frau Dr. Cindy Meyer durchgeführt.

Die Anzahl der notwendigen Amplifikationsschritte stagnierte dabei bis Selektionsrunde 6 zwischen 18 und 19 PCR-Zyklen und nahm dann signifikant ab. Nach Selektionsrunde 11 waren dementsprechend nur noch vier PCR-Zyklen notwendig, um die DNA der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek wieder über eine native PAGE nachweisen zu können.

Um die Affinität der angereicherten RNA-Bibliothek zu überprüfen, wurden nach Selektionsrunde 10 erste Bindungstests durch Filterretentionsassay (FRA, 4.6.1) durchgeführt.

5.1.3 Analyse der Affinität der angereicherten RNA-Bibliothek für die IL-6R D3 und den sIL-6R.

Nach zehn SELEX-Zyklen wurde die Fähigkeit der angereicherten RNA-Bibliothek, die IL-6R D3 zu binden, untersucht. Die Bindung sollte über einen FRA (4.6.1) untersucht werden, was eine radioaktive Markierung der RNA voraussetzt. Zunächst wurden deshalb je 20 pmol PAGE-gereinigter RNA der Ausgangsbibliothek, sowie der RNA der Selektionszyklen 5 und 10 (Sel. 5, Sel. 10) durch die Übertragung des γ -Phosphats von γ -³²P ATP auf die 5'-Termini der entsprechenden RNA-Proben radioaktiv markiert (4.3.7).

Ergebnisse

Erste FRA-Analysen mit der IL-6R D3 erbrachten zunächst kein schlüssiges Ergebnis und zeigten zum Teil ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen Proteinkonzentration und Signalstärke der verwendeten RNA. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass die verwendeten Aliquots der IL-6R D3 Nukleaseaktivität aufwiesen und bei Co-Inkubation mit der RNA-Bibliothek zu deren Degradation führten. Es wurden deshalb zunächst FRAs mit dem sIL-6R durchgeführt, um die Bindung der Sel. 5 und 10 zu quantifizieren (Abbildung 15A). Zudem wurde noch ein weiterer Selektionszyklus durchgeführt und die angereicherte RNA-Bibliothek Sel. 11 nochmals auf Bindung zur der IL-6R D3 getestet. Um die Nukleaseaktivität der vorliegenden IL-6R D3 Aliquots zumindest teilweise zu kompensieren, wurde tRNA im Überschuss zur markierten RNA der Bibliothek ($>1 \mu\text{M}$ tRNA - $<1 \text{ nM}$ RNA-Bibliothek Endkonzentration) vor der Inkubation mit der IL-6R D3 eingesetzt.

Ergebnisse

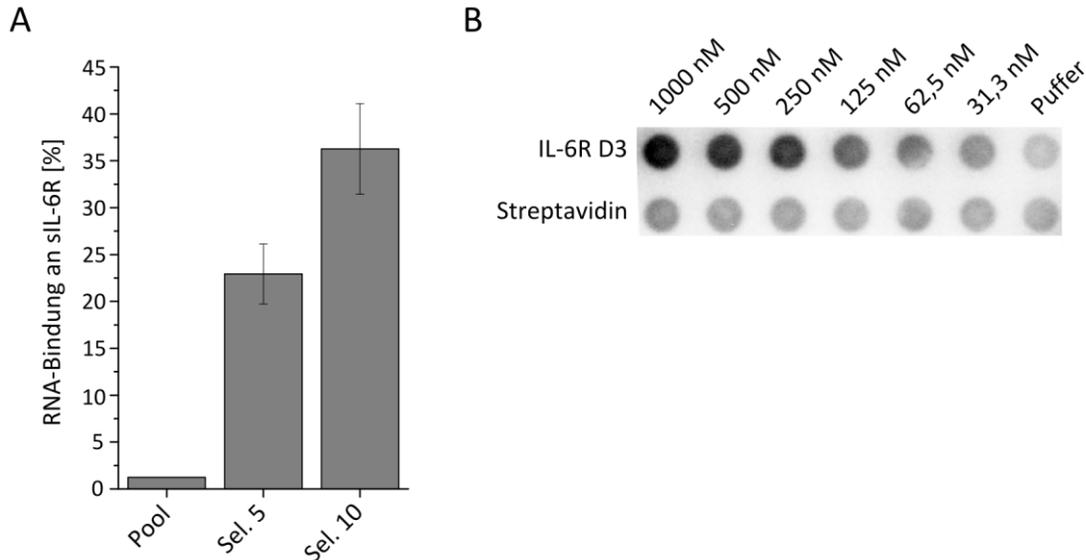


Abbildung 15: Filterretentionsassays zur Überprüfung der Affinität der unselektierten R1-RNA-Bibliothek sowie der Produkte der Selektionszyklen 5 und 10 und 11 für den sIL-6R (Sel. 5 und Sel. 10) sowie die IL-6R D3 (Sel. 11).

(A) je 1000 nM sIL-6R wurden nach Zugabe der ^{32}P markierten RNA der unselektierten R1-RNA-Bibliothek sowie der Selektionszyklen 5 und 10 für 30 min in 1x SELEX-Puffer inkubiert und proteingebundene Aptamere anschließend durch Filtration über eine Nitrozellulosemembran von freien RNA-Oligonukleotiden getrennt. Zudem wurden Pufferkontrollen mit gleichen Mengen an Nukleinsäuren erstellt, um die Hintergrundbindung der RNA an die Nitrozellulosemembran zu bestimmen. Anschließend wurde die maximale Bindung von je drei Messpunkten nach Abzug der Hintergrundbindung in Prozent dargestellt. (B) Ausgehend von je 1000 nM Ausgangskonzentration von IL-6R D3 und Streptavidin wurden 1:2-Verdünnungsreihen erstellt und nach Zugabe von ^{32}P markierter RNA des Selektionszyklus 11 30 min in 1x SELEX-Puffer inkubiert. Nach Filtration der RNA über eine Nitrozellulosemembran wurde die Membran über Nacht exponiert und nach Einscannen durch einen Phosphoimager ausgewertet.

Während die RNA der unselektierten Bibliothek nahezu keine Affinität für den sIL-6R bei 1000 nM Proteinkonzentration aufwies, konnten sowohl für die angereicherten Proben von Sel. 5 als auch Sel. 10 eine Bindung an den sIL-6R nachgewiesen werden (Abbildung 15A). Aufgrund des verwendeten Zielmoleküls ließ sich nicht feststellen, ob die RNA die Domäne 3 des IL-6R banden. Die Zunahme der Signalstärke zwischen den FRAs von Sel. 5 und Sel. 10 deutete jedoch auf eine erfolgreiche Selektion von IL-6R-D3-spezifischen Aptameren hin, da nur die membranproximale Domäne als Zielmolekül in der SELEX verwendet wurde. Die Nukleaseaktivität in den verwendeten Aliquots der IL-6R D3 konnte durch Einsatz von tRNA zudem ausreichend gut kompensiert werden, um die Bindung der Sel. 11 auch an die Domäne 3 des IL-6R nachzuweisen (Abbildung 15B). Da die IL-6R D3 über die Wechselwirkung von Streptavidin und Biotin an die verwendeten magnetischen Partikel gekoppelt war und somit das Risiko bestand, Streptavidin-spezifische

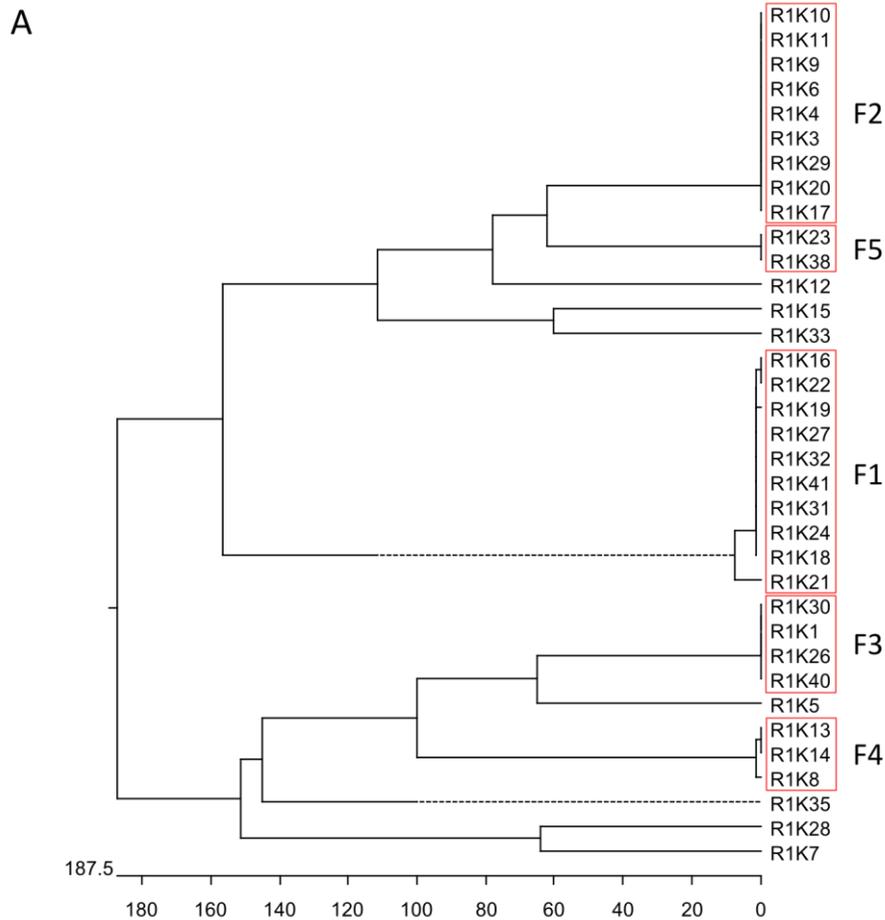
Ergebnisse

Aptamere in der SELEX anzureichern, wurde die Interaktion von Sel. 11 zu Streptavidin ebenfalls durch FRA untersucht. Es konnte jedoch keine Bindung des angereicherten Pools an Streptavidin beobachtet werden (Abbildung 15B). Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein wesentlicher Anteil der im Pool enthaltenen RNA zur Bindung der IL-6R D3 befähigt war, wurden die Templat-DNA der RNA-Bibliothek der Sel. 11 zunächst kloniert und einzelne Klone anschließend sequenziert.

5.1.4 Klonierung und Sequenzierung der für die IL-6R D3 angereicherten Bibliothek

Nachdem die Bindung der RNA-Bibliothek nach Sel. 11 sowohl für die IL-6R D3 als auch den sIL-6R nachgewiesen werden konnte, wurde die entsprechende cDNA in den Vektor pUC-19T kloniert (4.5). Die T/A-Klonierung (4.5.1, 4.5.2) sollte sicherstellen, dass die PCR-Produkte ohne deren vorherige Restriktion in den Vektor eingebracht werden konnten. Da die randomisierte Kernregion der Nukleinsäure-Bibliothek potentiell Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen aufweisen könnte, wurde so die Integrität der DNA-Moleküle sichergestellt. Nach der Ligation von DNA-Bibliothek und pUC-19T wurden *E. coli*/Top10-Zellen mit dem rekombinanten Vektor transformiert (4.5.4) und die Plasmid-DNA aus monoklonalen Kolonien durch Minipräparation isoliert (4.5.5). Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch das Unternehmen GATC (Konstanz). Von den eingeschickten 41 Vektor-Proben wurden 35 erfolgreich sequenziert. Zur Auswertung wurden die randomisierten Kernregionen der sequenzierten Klone durch den Jotun-Hein-Algorithmus¹⁵² des Programms MegAlign *aligned* und ein Stammbaum der Klone erstellt (4.5.7). Dem phylogenetischen Vergleich einzelner Sequenzen durch diese Herangehensweise liegt natürlich die falsche Voraussetzung zu Grunde, dass die Sequenzen von einem einzelnen gemeinsamen Vorfahren abstammen; eine Bedingung, die mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit unzutreffend ist. Dies gilt dementsprechend auch für die durch den Algorithmus ermittelte Distanz (Nukleotidsubstitutionen pro 100 Basen) zwischen der „Wurzel“ des Stammbaums und den die einzelnen Oligonukleotidspezies repräsentierenden „Astspitzen“. Dennoch können durch diese Vorgehensweise identische und ähnliche Sequenzen identifiziert werden, die entweder von einem gemeinsamen Vorfahren abstammten oder ein konvergentes Sequenzmotiv aufwiesen. Die Auswertung der Sequenzierung ist in Abbildung 16 dargestellt.

Ergebnisse



B

F1: ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTYGTCGCAAGCTGG (C)
 F2: CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC
 F3: GAAGAGAGAAAAGCCAGTAGAGGGAAGAGGGATGAGGGACGTGGGAATCTTGGTAATCAGT
 F4: TAAAAA (AAA) CGGCCCATCGTTTGGCRCTGTGGGAGTGGAGGGTGGATGGTGTTAAGCGATTGG
 F5: GTGTGGAGTAGGGCGGAGGGAATTTAAGGGTGGTTAATTCACAAGTCTCATTCT

Abbildung 16: Auswertung der Sequenzierung der DNA-Spezies der R1-Bibliothek. Die von den konstanten Regionen der R1-Bibliothek flankierten Kernregionen der 35 erfolgreich sequenzierten Klone wurde durch den Jotun-Hein-Algorithmus (*Gap Penalty: 11, Gap Length Penalty: 3*) verglichen und identische sowie homologe Sequenzmotive durch das Erstellen eines phylogenetischen Stammbaums in Familien (F) gruppiert. (A) Phylogenetischer Stammbaum nach Jotun-Hein-Alignment. Angegeben sind die Distanzen (Nukleotidsubstitutionen pro 100 Basen) und die aus dem Stammbaum abgeleiteten Familien (F1-5, rote Kästen). Monoklonale Sequenzen mit einer Distanz (Nukleotidsubstitutionen pro 100 Basen) <10 wurden jeweils einer Sequenzfamilie zugeordnet. (B) Die Sequenzen der F1-5 wurden nochmals untereinander *aligned* und die Konsensus-Sequenzen dargestellt. Substitutionen einzelner Basen wurden im IUPAC-Code angegeben, Insertionen einer oder mehrerer Basen in Bezug auf die Konsensus-Sequenz sind in Klammern angegeben.

Ergebnisse

Von den 35 ausgewerteten Klonen wiesen 28 eine Kernsequenz auf, die mehr als einmal in der Sequenzierung identifiziert werden konnte. Das vermehrte Auftreten identischer oder ähnlicher Sequenzen wurde als Folge der Anreicherung in der SELEX gewertet und die entsprechenden Sequenzen nach Häufigkeit fünf Familien (F1-5) zugeordnet (Abbildung 16).

Am häufigsten wurden Klone der F1 in der Sequenzierung nachgewiesen. Abweichend von der Konsensus-Sequenz wiesen Klon (K) 16 und 22 der F1 an Position 46 der Kernregion ein Cytosin statt eines Thymins auf. Die Kernregion war bei allen sequenzierten Klonen mit Ausnahme von Klon 21 zudem um zwei Nukleotide verkürzt. Auch bei der F2 wurde eine Verkürzung der Kernregion beobachtet; jeder der neun identischen Klone wies 59 Nukleotide zwischen den beiden konstanten Regionen auf. F3, sowie zwei der drei identifizierten Klone der F4, besaßen eine 60 bp Kernregion. Eine Insertion von drei Adeninen im A-reichen 5'-terminalen Bereich von Klon 8 führte beim dritten Vertreter der F4 jedoch zu einer Verlängerung der Kernregion.

5.2 Charakterisierung der identifizierten Aptamer-Kandidaten

In der Analyse von 35 repräsentativen Klonen der für die IL-6R D3 angereicherten RNA-Bibliothek R1 wurden fünf mutmaßlich nicht verwandte Sequenzfamilien identifiziert. Zwei dieser Familien, F1 (10 Klone) und F2 (9 Klone) waren dabei besonders häufig vertreten. F3-5 (F3, 4 Klone; F4, 3 Klone; F5 2 Klone) waren deutlich seltener nachweisbar. Zunächst wurden repräsentative Vertreter der fünf Sequenzfamilien charakterisiert.

5.2.1 Überprüfung der verwendeten Proteine

Um Bindung und Spezifität der identifizierten Aptamer-Kandidaten untersuchen zu können, wurden IL-6R (41 kDa), Hyper-IL-6 (57 kDa) und sgp130Fc (140 kDa, Monomer) sowie IL-6 (21 kDa) vor dem Durchführen der Bindungstests über Analyse an einer *Tape Station* (Agilent Technologies, 4.1.2) durch denaturierende SDS-PAGE analysiert.

Ergebnisse

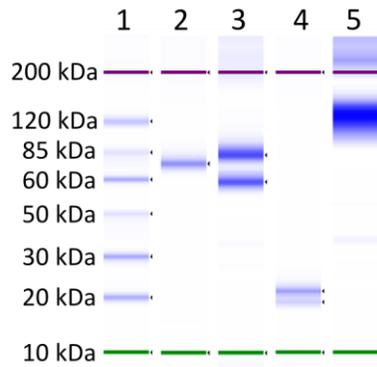


Abbildung 17: Analyse der für die Bindungstests verwendeten Proteine durch Elektrophorese in einer 2200 TapeStation. Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für *P200 Screen Tapes* unter denaturierendem Puffer. Die Einstellungen des Geräts für die Analyse entsprachen den Grundeinstellungen des Instruments. 1: *P200 Ladder*, 2: sIL-6R, 3: Hyper-IL-6, 4: IL-6, 5: sgp130Fc

Die Analyse (Abbildung 17) zeigte für sIL-6R, IL-6 und sgp130Fc den Erwartungen entsprechende Ergebnisse. Aufgrund der Glykosylierung entspricht die Position der Proteine in Relation zum Marker nicht dem eigentlichen Molekulargewicht. Die Proben zeigten zudem je nur eine dominante Bande, weshalb sie als ausreichend rein für die Bindungstests erachtet wurden. Nach der elektrophoretischen Trennung konnten in der Hyper-IL-6-Probe jedoch zwei dominante Banden beobachtet werden. In Relation zum Marker zeigten diese ein apparentes Molekulargewicht von ca. 82 kDa bzw. 59 kDa. Es wurde angenommen, dass es sich im Falle der höher laufenden Bande um Hyper-IL-6 handelte; zur Identifikation der unteren Bande wurde eine massenspektrometrische Untersuchung im Labor von Prof. Dr. Schlüter (UKE, Hamburg) durchgeführt, in der die zweite Bande als Verunreinigung durch bovines Hämopexin identifiziert werden konnte. Für Experimente mit Hyper-IL-6 wurde daher eine neue Charge des Proteins verwendet. Diese war unter Verwendung eines optimierten Protokolls gereinigt worden und wies keine Verunreinigungen auf.

5.2.2 FRA-Analyse der Sequenzfamilien 1-5

Für die weitere Überprüfung der identifizierten Kandidaten wurden zunächst repräsentative Klone der F1-5 ausgewählt und ihre Affinität zum sIL-6R über FRA getestet (4.6.1). Die Bindungstests wurden unter den gleichen Pufferbedingungen wie die Selektion der Aptamere

Ergebnisse

durchgeführt, wobei jedoch nicht SELEX-Puffer mit 1 mg/mL BSA (4.6.1) sondern SELEX-Puffer mit ca. 2 μ M tRNA verwendet wurde, um eine unspezifische Bindung der markierten RNA zu verhindern. Während innerhalb der F2, F3 und F5 alle identifizierten Klone sequenzidentisch zueinander waren, wiesen drei Klone der F1 und ein Klon der F4 Abweichungen zur jeweiligen Konsensus-Sequenz auf. Da einzelne Klone der F2 und F4 Sequenzvariationen innerhalb der Kernregion zeigten (Abbildung 16), wurden K41 (F2) und K13 (F4) als repräsentative Vertreter dieser Familien verwendet. Um die Einheitlichkeit der Nomenklatur zu bewahren und die leichtere Zuordnung der Klone zu gewährleisten, werden diese in den folgenden Experimenten weiterhin als F2 (K41) und F4 (K13) betitelt.

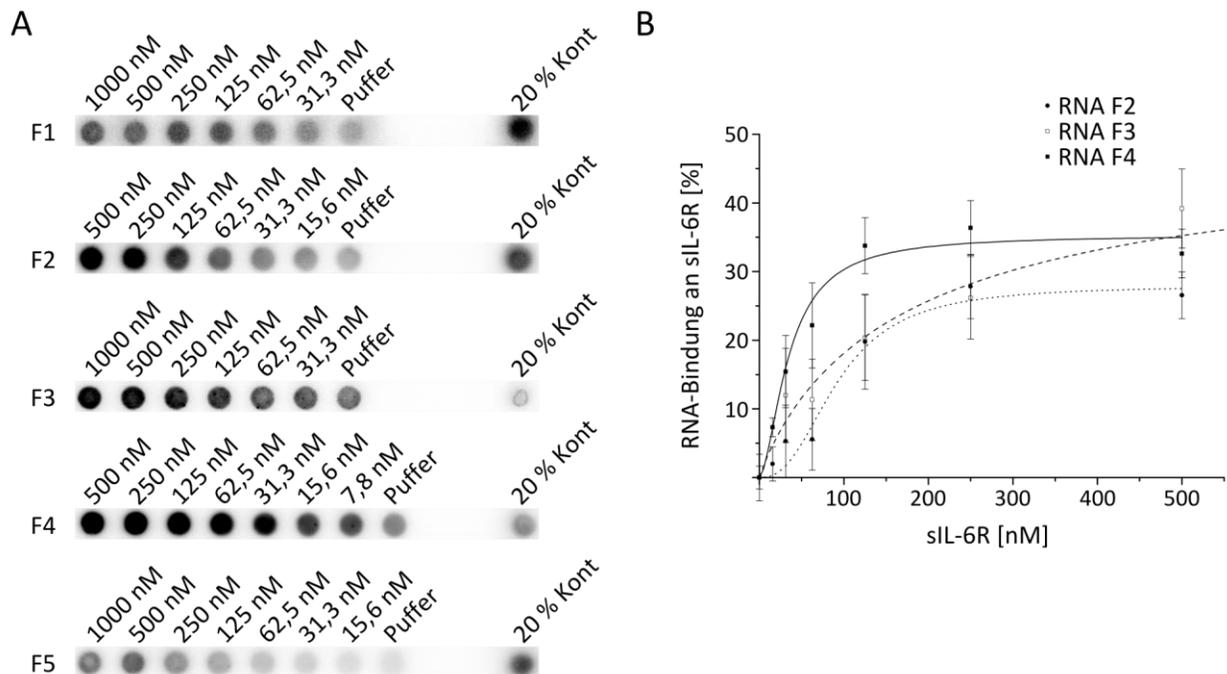


Abbildung 18: Charakterisierung der Affinität repräsentativer Klone der F1-5 für den sIL-6R. (A) Die experimentelle Überprüfung der Affinität der Aptamer-Kandidaten erfolgte über Filterretentionsassays und wurde autoradiographisch nachgewiesen. (B) Auswertung des Anteils proteingebundener RNA in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration für die F2-4 durch FRA. Die in der Grafik dargestellten Messpunkte und Standardabweichungen beruhen auf der Auswertung von je drei unabhängig voneinander hergestellten Verdünnungsreihen. Die Bindungskurve wurde durch mathematische Angleichung mit der Hill1-Gleichung in Origin erstellt.

Die am häufigsten in der Auswertung der Sequenzierung identifizierte F1 wies nur eine schwache Affinität für den sIL-6R auf. Die maximale Bindung der F1 betrug bei einer 1000 nM sIL-6R Konzentration ca. 6%. Auch konnte keine eindeutige Korrelation zwischen Proteinkonzentration

Ergebnisse

und Signalstärke der einzelnen Messpunkte festgestellt werden (Abbildung 18A). Es wurde deshalb von einer weiteren Charakterisierung der Oligonukleotide dieser Sequenzfamilie abgesehen. Die F5 wies ebenfalls nur eine schwache Bindung an den sIL-6R auf und wurde deshalb für nachfolgende Experimente nicht weiter berücksichtigt.

F2-F4 zeigten dagegen eine sIL-6R-abhängige Bindung im FRA (Abbildung 18). Die durch die Auswertung der FRA-Analyse in Origin (4.6.1) ermittelten Dissoziationskonstanten der F2-4 sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Affinität der Aptamere der F2, F3 und F4.

Aptamer	K_d [nM]
F2	$92,7 \pm 18,3$
F3	179 ± 117
F4	$34,8 \pm 5,8$

Obwohl die Klone der F4 weniger als 10% der identifizierten Sequenzspezies repräsentierten, wiesen sie im FRA mit 34.8 ± 5.8 nM die höchste Affinität für den sIL-6R auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Gruppen. So konnten Schütze *et al.*¹⁵⁸ nach systematischer Analyse einer Modell-SELEX für Streptavidin zeigen, dass die Häufigkeit einer Sequenzspezies in einer angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek nicht zwangsläufig mit deren Affinität zum Zielmolekül korreliert.

Es wurden deshalb auch die verbliebenen, nur einzeln vorkommenden sieben Sequenzspezies (Abbildung 16) auf Bindung an den sIL-6R untersucht. Allerdings konnte von diesen nur für R1K12 (Abbildung 16A) eine geringe Bindung an Hyper-IL-6 festgestellt werden. Diese reichte jedoch nicht an die Affinität der F2-4 heran, weshalb R1K12 nicht weiter charakterisiert wurde.

5.2.3 Charakterisierung der Spezifität der sIL-6R bindenden Aptamerfamilien F2 und F4

Eine mögliche Anwendung für IL-6R-spezifische Aptamere ist die Blockierung der Formation des IL-6-spezifischen Signaltransduktionskomplexes (IL-6-STK) IL-6/IL-6R/gp130. Zunächst wurde durch *electrophoretic mobility shift assay* EMSA (4.6.2) kontrolliert, ob die verwendeten Proteinchargen von sIL-6R, IL-6 und sgp130Fc aktiv waren und sich die Ausbildung des IL-6-STK unter den verwendeten Pufferbedingungen vollzog. Eine direkte Überprüfung der

Ergebnisse

Auswirkungen durch Bindung von F2 und F4 an den sIL-6R auf die Ausbildung des IL-6-STK durch EMSA war nicht möglich. Beide IL-6R-D3-bindenden Aptamere zeigten nur eine sehr geringe maximale Bindung in diesem Assay. Eine direkte Überprüfung der Auswirkungen auf die Ausbildung des IL-6-STK durch Bindung von F2 oder F4 an den sIL-6R durch EMSA war aus diesem Grund nicht möglich. Das von Dr. Cindy Meyer selektierte RNA-Aptamer AIR-3A wurde deshalb als Sonde verwendet, um die Aktivität der verwendeten Proteinchargen zu belegen. Die Bindung dieses Aptamers an den sIL-6R zeigte in früheren Versuchen keine Auswirkungen auf die Ausbildung des IL-6-STK¹⁵⁰ und erlaubte es deswegen die Bildung des IL-6-STK *in vitro* nachzuverfolgen. Die Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen durch EMSA bietet den Vorteil, dass sich die relative Mobilitätsdifferenz von Protein-RNA-Komplexen mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachweisen lässt. Der aus der Bindung von AIR-3A an den sIL-6R resultierende *Shift* ermöglicht so die Differenzierung zwischen freiem sIL-6R sowie sIL-6R im Kontext des IL-6/sIL-6R- und IL-6/sIL-6R/sgp130Fc-Komplexes

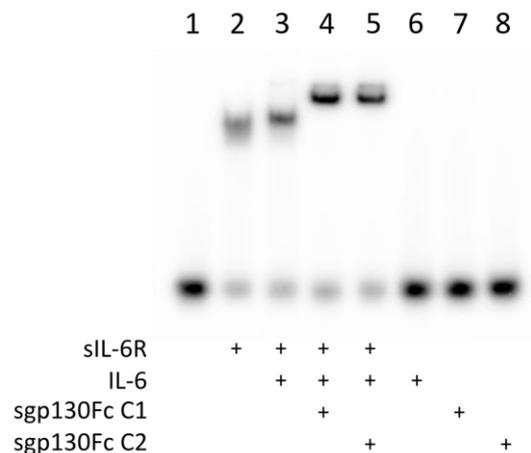


Abbildung 19: EMSA zur Untersuchung der Ausbildung des IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Proteinkomplexes. Zunächst wurden die entsprechenden Proteinproben vereinigt und in 1x SELEX-Puffer für 15 min inkubiert. Für den Versuch wurden finale Proteinkonzentrationen von 200 nM für den sIL-6R sowie 800 nM für sgp130Fc und IL-6 gewählt. Auf diesem Weg sollte eine Sättigung der Protein-Protein-Interaktionsstellen des sIL-6R erzielt werden. Nach Zugabe des ³²P markierten AIR-3A wurde nochmals für 15 min inkubiert. Die jeweiligen Proben wurden anschließend auf ein natives, auf 4 °C vorgekühltes, 3,5%iges PAA-Gel aufgetragen. Die PAGE wurde ebenfalls bei 4 °C und einer Spannung von 80 V durchgeführt. Es wurden zwei Chargen (C) sgp130Fc getestet.

Die Ausbildung der IL-6/sIL-6R- und IL-6/sIL-6R/sgp130Fc-Komplexe konnte anhand des EMSA eindeutig nachvollzogen werden. Während zwischen der Laufhöhe von sIL-6R und IL-6/sIL-6R (Abbildung 19 Bahn 2 und 3) nur geringe Unterschiede festgestellt wurden, zeigte der vollständige

Ergebnisse

IL-6/sIL-6R/sgp130Fc-Komplex im Falle beider untersuchter sgp130Fc-Chargen eine deutlich verringerte Mobilität im PAA-Gel (Abbildung 19 Bahn 4 und 5). Für die IL-6R-D3-bindenden Aptamere wurde aufgrund der geringen maximalen Bindung von F2 und F4 im EMSA auf FRA zurückgegriffen. Zunächst wurde mit F4 das Aptamer mit der höchsten Affinität für den sIL-6R untersucht. Neben dem Einfluss von IL-6 und sp130Fc auf die Bindung von F4 sollte festgestellt werden, ob die Bindung des IL-6R-spezifischen Aptamers AIR-3A die Proteinbindung von F4 beeinflusst.

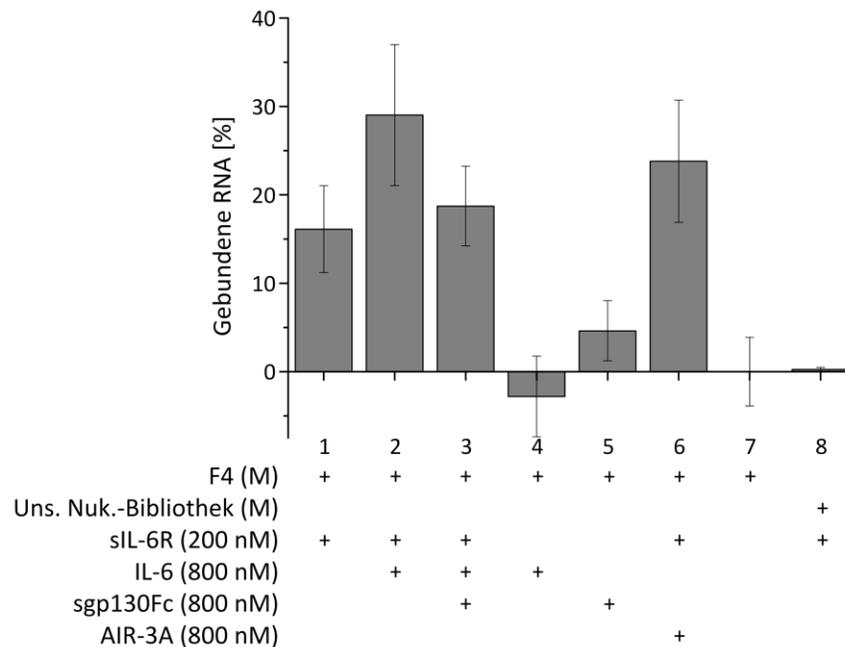


Abbildung 20: FRA zur Untersuchung der Ausbildung des IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Proteinkomplexes in Anwesenheit von F4. Zunächst wurden die entsprechenden Proteinproben vereinigt und in 1x SELEX-Puffer für 15 min inkubiert. Für den Versuch wurden finale Proteinkonzentrationen von 200 nM für den sIL-6R sowie 800 nM für sgp130Fc, IL-6 und AIR-3A gewählt. Auf diesem Weg sollte eine Sättigung der Protein-Protein-Interaktionsstellen des sIL-6R erzielt werden. Nach Zugabe des ³²P markierten (M) F4 wurde nochmals für 15 min inkubiert. Als Kontrolle diente die unselektierte Ausgangsnukleinsäure-Bibliothek R1 (Uns. Nuk.-Bibliothek)

Im FRA konnte die Bindung von F4 sowohl an den freien sIL-6R als auch den komplett ausgebildeten IL-6-STK nachgewiesen werden. Der hohe molare Überschuss von IL-6, beziehungsweise sgp130Fc gegenüber dem ³²P-markiertem Aptamer, sollte gewährleisten, dass eine Verdrängung der Proteine durch den F4-Klon ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund der Ergebnisse ließ sich schlussfolgern, dass die Bindung von F4 nicht mit der Ausbildung des IL-6-STK konkurriert und dementsprechend nicht zur direkten Inhibition der IL-6 abhängigen

Ergebnisse

Signaltransduktion geeignet ist. Die Zugabe von AIR-3A im hohen molaren Überschuss hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Bindung von F4. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da AIR-3A in von Dr. Cindy Meyer durchgeführten Untersuchungen keine Bindung an Domäne 3 des IL-6R zeigte, vermutlich also Spezifität für eine andere Domäne des IL-6R aufweist.

Es folgte die Untersuchung von F2, welches im FRA ebenfalls eine hohe Affinität für den sIL-6R aufwies und deshalb als möglicher Kandidat für die Blockierung der Formation des IL-6-STK berücksichtigt wurde. Neben der Charakterisierung der Bindung von F2 an sIL-6R, IL-6/sIL-6R und IL-6/sIL-6R/sgp130Fc wurde auch überprüft, ob F2 und F4 um dieselbe Position bei der Bindung am sIL-6R konkurrieren.

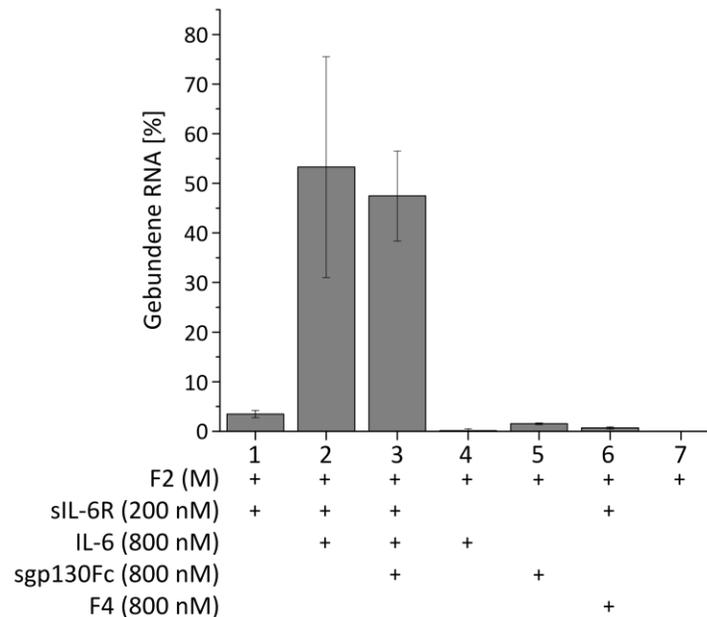


Abbildung 21: FRA zur Untersuchung der Bindung von F2 an den IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Proteinkomplex. Zunächst wurden die entsprechenden Proteinproben vereinigt und in 1x SELEX-Puffer für 15 min inkubiert. Für den Versuch wurden finale Proteinkonzentrationen von 200 nM für den sIL-IL-6R sowie 800 nM für sgp130Fc, IL-6 und F4 gewählt. Auf diesem Weg sollte eine Sättigung der Protein-Protein-Interaktionsstellen des sIL-6R erzielt werden. Nach Zugabe des ³²P markierten F4 wurde nochmals für 15 min inkubiert. 1: F2 + sIL-6R, 2: F2 + IL-6/sIL-6R, 3: F2 + IL-6/sIL-6R/sgp130Fc, 4: F2 + IL-6, 5: F2 + sgp130Fc, 6: F2 + sIL-6R/F4, 7: F2.

Während die Bindung von F2 an den freien sIL-6R sehr gering war (Abbildung 21, Balken 1), zeigte sich eine deutliche Bindung an sIL-6R im Kontext des IL-6/sIL-6R- und des IL-6/sIL-6R/sgp130Fc-Komplexes (Abbildung 21, Balken 2 und 3). Es wurden bereits in früheren Experimenten, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, eine höhere maximale Bindung von sIL-6R bindenden Aptameren

Ergebnisse

in FRAs beobachtet, wenn die Bindungstests mit dem Designer-Zytokin Hyper-IL-6 oder unter Anwesenheit von IL-6 durchgeführt wurden. Dieser Effekt könnte aus einer stärkeren Bindung des IL-6/sIL-6R-Komplexes an die Nitrozellulosemembran resultieren. Warum dieser Effekt im Falle von F2 jedoch so ausgeprägt ausfiel, ist unklar. Da die Bindung von F2 an den IL-6-STK in dem durchgeführten Experiment jedoch nachgewiesen werden konnte, wurde von einer Wiederholung des Experiments abgesehen. Eine sichere Aussage über Konkurrenz zwischen F2 und F4 um die Bindestelle am sIL-6R konnte aufgrund der geringen maximalen Bindung von F2 nicht getroffen werden. Die weitere Abnahme der Signalstärke (Abbildung 21 Balken 6) legt jedoch nahe, dass beide Aptamere das gleiche Epitop des sIL-6R binden.

Der Fokus für die weitere Charakterisierung der Aptamere wurde auf F4 gelegt, da dieses Aptamer die höchste Affinität für den sIL-6R aufwies (Tabelle 17).

5.3 Verkürzung und strukturelle Charakterisierung des IL-6R D3-spezifischen Aptamers F4

Die Verkürzung eines Aptamers auf das für die Zielmolekülbindung verantwortliche minimale Bindemotiv reduziert, vor allem bei RNA-Aptameren, die Kosten für die Festphasensynthese erheblich. Zudem wird die Aufklärung der Struktur des Aptamers vereinfacht, da das unverkürzte Aptamer neben dem eigentlichen Bindemotiv weitere Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweisen kann. Die Verkürzung der für die Struktur verantwortlichen Sequenz auf das minimale Bindemotiv ermöglicht dagegen gezieltere Aussagen über die strukturellen Hintergründe der Interaktion von Aptamer und Zielmolekül.

5.3.1 Minimierung von F4 anhand von Sekundärstrukturvorhersagen

Die Bildung bestimmter Struktur motive wie Stamm-Schleifen, interne Schleifen und Kreuzungen lassen sich mit Algorithmen anhand der Sequenz einer Nukleinsäure durch Berechnung der energetisch optimalen Sekundärstruktur vorhersagen. Obwohl nicht alle Struktur motive *in silico* berechnet werden können und die tatsächliche Struktur von der Vorhersage abweichen kann, lassen sich auf Basis der erhaltenen Sekundärstrukturen putative Bindemotive des Aptamers ableiten. Ungepaarte Basen, wie sie beispielsweise in Schleifen vorliegen, stehen mit höherer Wahrscheinlichkeit für die Interaktion mit dem Zielmolekül des Aptamers zur Verfügung als

Ergebnisse

Basen, die über Watson-Crick-Wasserstoffbrücken in die Ausbildung eines Stamms involviert sind. Für die Vorhersage der Sekundärstruktur von F4 wurden die Ergebnisse der webbasierten Software-Pakete *mfold*¹⁵⁹, *RNAfold*¹⁶⁰ und *RNAstructure*¹⁶¹ miteinander verglichen. Letztgenanntes berücksichtigt neben klassischen Sekundärstrukturmotiven zudem auch Pseudoknoten. Die Strukturvorhersage für F4 mit der geringsten freien Energie war bei allen drei Software-Pakete nahezu identisch.

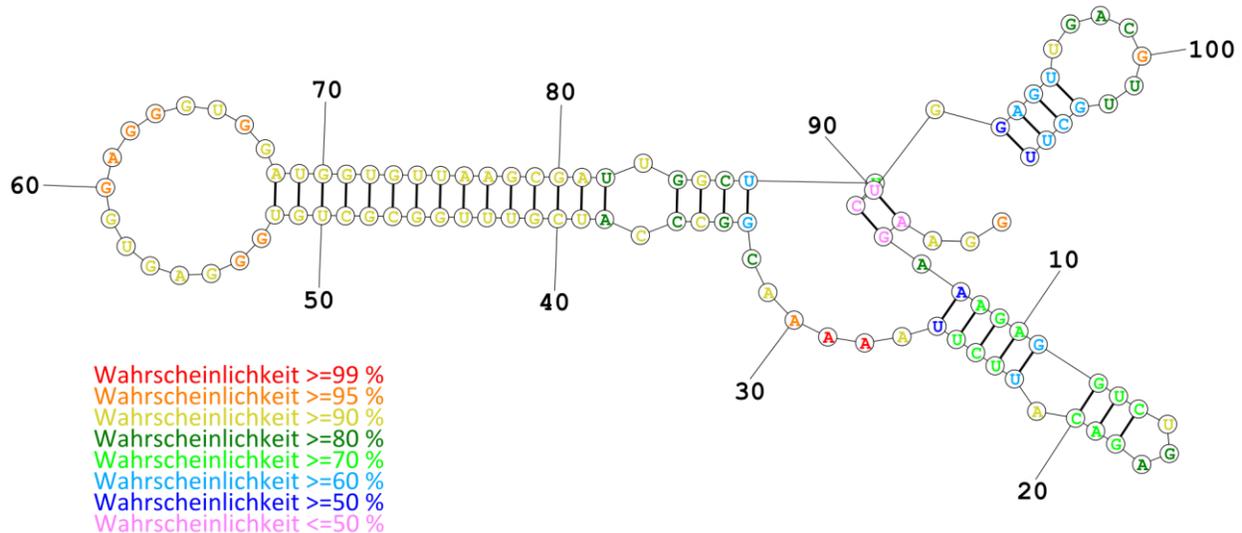


Abbildung 22: Sekundärstrukturvorhersage des IL-6R D3 spezifischen RNA-Aptamers F4. Die vollständige Sequenz von F4 (Klon13) wurde in das Browser-basierte Programm *RNAstructure* eingegeben. Die Sekundärstrukturvorhersage fand unter Verwendung der Standardeinstellungen des Programms statt. Es wurde die Sekundärstrukturvorhersage mit der geringsten Gibbs-Energie übernommen.

Die Sekundärstrukturvorhersagen von F4 (Abbildung 24) durch *mfold*, *RNAfold* und *RNAstructure* wurden übereinstimmend von einer nahezu die gesamte Kernregion umfassenden Stamm-Schleife dominiert. Bis auf die ersten beiden Basen der 3'-Terminalen Region waren keine Nukleotide der konstanten Region an der Ausbildung dieses putativen Strukturelements beteiligt. Drei Klone wurden nach Auswertung der Sequenzierung der F4 zugeordnet. Während K13 und K14 identische Sequenzen aufwiesen, zeigte K8 zwei Mutationen, zum einen die Punktmutation G48A, die ein G-U „Wobble“-Basenpaar im putativen Stamm der Sekundärstrukturvorhersage in ein A-U Watson-Crick-Basenpaar überführen würde, zum anderen die Insertion dreier zusätzlicher Adenine an Position 32 (Abbildung 23). Es wurde nicht davon ausgegangen, dass eine

Ergebnisse

der beiden Mutationen einen Einfluss auf die Affinität des Aptamers für den sIL-6R bedeuten würde.

```
K13: 5' -UAAAAA---CGGCCCAUCGUUUGGC G CUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUGUUAAGCGAUUGG-3'  
K14: 5' -UAAAAA---CGGCCCAUCGUUUGGC G CUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUGUUAAGCGAUUGG-3'  
K08: 5' -UAAAAA AAA CGGCCCAUCGUUUGGC A CUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUGUUAAGCGAUUGG-3'
```

Abbildung 23: Variable Kernregion der Klone, die der Sequenzfamilie 4 (F4) zugeordnet wurden.

Ausgehend von dem in Abbildung 22 dargestellten Modell wurden zunächst die konstanten Regionen des F4 sowie die nicht an der Ausbildung der putativen Stammschleife beteiligten ersten sieben Nukleotide der Kernregion entfernt. Die Ergebnisse der Strukturvorhersage sowie die Vorgehensweise bei der sukzessiven Verkürzung von F4 anhand dieser Vorhersage sind am Beispiel des durch *RNAstructure* ermittelten Modells in Abbildung 24 dargestellt.

Ergebnisse

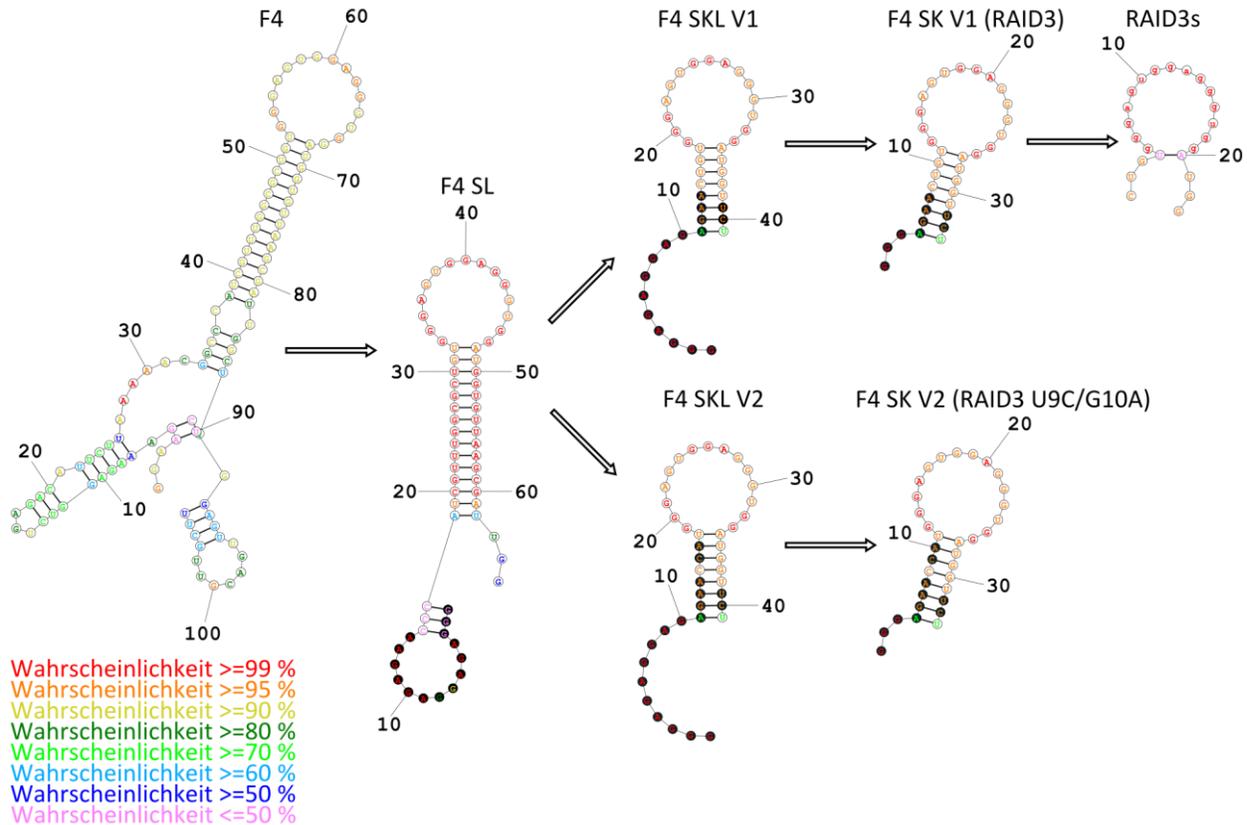


Abbildung 24: Sekundärstrukturvorhersagen für F4 und deren verkürzte Varianten durch *RNAstructure*. Für die Prognose der Sekundärstruktur wurden die Standardeinstellungen der webbasierten Version von *RNAstructure* verwendet. Die Sekundärstrukturvorhersage mit der geringsten freien Energie von F4 wurde als Templat für die Verkürzung des Aptamers verwendet. Die Wahrscheinlichkeit für die jeweiligen Basenpaarungen sind farblich markiert dargestellt. Für die erste Stufe der Minimierung wurden die konstanten Regionen sowie die ersten sieben Nukleotide der Kernregion des Aptamers entfernt (F4 „Stamm Leader, SL). Es wurde zudem eine für die Transkriptionsinitiation optimierte 14 nt Sequenz am 5'-Ende eingefügt. Nicht direkt aus F4 übernommene Nukleotide wurden in der Abbildung schwarz hinterlegt. Nachdem die Bindung von F4 SL an den sIL-6R durch FRA nachgewiesen wurde, wurden vier weitere Varianten erstellt. Im Falle der „Stamm Kurz Leader“ (SKL) Varianten 1 und 2 wurde die für die Transkriptionsinitiation optimierte 14 nt Sequenz beibehalten und zwei Nukleotide im 3'-Terminus für die Aufrechterhaltung des putativen Stammes angepasst. Im Falle der „Stamm Kurz“ Varianten wurde eine verkürzte „Leader-Sequenz“ für die optimierte Transkriptionsinitiation verwendet. Im Falle der Variante 1 (V1) wurde der Stamm, von der Integration der „Leader-Sequenz“ abgesehen, nicht weiter modifiziert. In den Varianten 2 (V2) wurden die Basen 9 und 10 angepasst (U9C, G10A) um die *Wobble*-Basenpaarungen zwischen U9 und G29 gegen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen auszutauschen.

Die Transkription von direkten Verkürzungen von F4 gestaltet sich zunächst schwierig. Eine schlechte Ausbeute und das Auftreten von Artefakten in Form von RNA-Oligonukleotiden mit variablen Längen in der *in vitro*-Transkription machten eine Charakterisierung der Varianten

Ergebnisse

zunächst unmöglich. Das Auftreten von abortiver Initiation während der Transkription limitiert die Initiationsrate bei starken Promotoren und kann zu einer drastisch reduzierten Ausbeute in der T7-Transkription führen¹⁶². Eine Transkriptions-optimierte Variante, F4 „Stamm Leader“ (SL), wurde deshalb mit einer 14 nt langen Purinsequenz ausgestattet (Abbildung 24), da die T7-Polymerase für die Inkorporation der ersten Nukleotide Purine bevorzugt. Der Übergang von der Initiationsphase zur Elongation findet nach der Transkription der ersten 12 nt statt¹⁶², die verlängerte „Leader Sequenz“ würde somit alle während der Initiation inkorporierten Basen abdecken. Die Optimierung der 5'-terminalen Region für die *in vitro*-Transkription verbesserte erwartungsgemäß die Ausbeute der RNA-Synthese enorm und reduzierte gleichzeitig die Bildung abortiver Transkripte unter die Nachweisgrenze der denaturierenden PAGE.

Bindungstests unter der Verwendung der Variante F4 SL (Abbildung 25) zeigten, dass weder die konstanten Regionen noch die terminalen Bereiche der variablen Region für die Bindung von F4 von Bedeutung sind. Das verkürzte Aptamer war immer noch in der Lage, den sIL-6R zu binden. Die Affinität des F4 SL an den sIL-6R wies keine signifikanten Unterschiede zum unverkürzten Aptamers auf.

Die putative Schleife innerhalb der variablen Region von F4 wurde als wahrscheinlichster Kandidat für das Bindemotiv von F4 angesehen, da ungepaarte Nukleinsäuren mehr Freiheitsgrade für chemische Interaktionen besitzen als solche, die durch Watson-Crick-Basenpaarungen in die Formation eines Stammes involviert sind. Diese Hypothese konnte in der systematischen Analyse von RNA-Protein-Interaktionen bestätigt werden, in der vor allem Sekundärstrukturelemente wie Stammschleifen als Vermittler der Interaktion von Nukleinsäuren und Proteinen identifiziert wurden¹⁶³. Das Potential der weiteren Minimisierung wurde anhand zweier Varianten getestet. Die „Stamm Kurz Leader“ (SKL)-Varianten wurden ebenfalls mit der „Leader Sequenz“ erstellt, um eine optimale Ausbeute der *in vitro* Transkription zu gewährleisten. Die „Stamm Kurz“ (SK) Varianten wurden mit der kürzeren T7-Wild-Typ-Promotorsequenz ⁺¹GGGAGA⁺⁶ versehen, die ebenfalls gute Ausbeuten der T7-Transkription ermöglicht¹⁶⁴, jedoch nicht an die Ausbeuten der SKL-Varianten heranreichte.

Die Optimierung von F4 SK V1 für die *in vitro* Transkription machte die Substitution der ersten sieben Basen des 5'-Terminus notwendig. Um diese auszugleichen und den putativen Stamm aufrechtzuerhalten, wurden zusätzlich zwei Nukleotide im 3'-Terminus durch komplementäre

Ergebnisse

Basen ersetzt. Die Veränderung des putativen Stammes hatte keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Aptamers den sIL-6R zu binden. Der Austausch G7A entspricht zudem der korrespondierenden Sequenz des F4 Klon 8 und dessen G48A-Punktmutation (Abbildung 23).

Neben der Optimierung der Initiation sollte getestet werden, ob eine weitere Stabilisierung des putativen Stamms einen Einfluss auf die Affinität von F4 zum sIL-6R ausübt. Es wurden deshalb neben den Varianten 1 (SK V1 und SKL V1) noch die Varianten 2 (SK V2 und SKL V2) erstellt, in denen die *Wobble*-Basenpaarungen zwischen U9 und G29 sowie G10 und U28 durch kanonische Basenpaare ersetzt wurden.

5.3.2 Charakterisierung der verkürzten F4-Varianten

Durch FRA wurde die Fähigkeit der F4-Verkürzungen, den sIL-6R zu binden, überprüft. Das bereits getestete Aptamer F4 SL diente hierbei als Positivkontrolle. Eine Zusammenfassung der Bindungsanalyse im Verlauf der Minimierung von F4 getesteten Aptamer-Varianten ist in Abbildung 25 dargestellt.

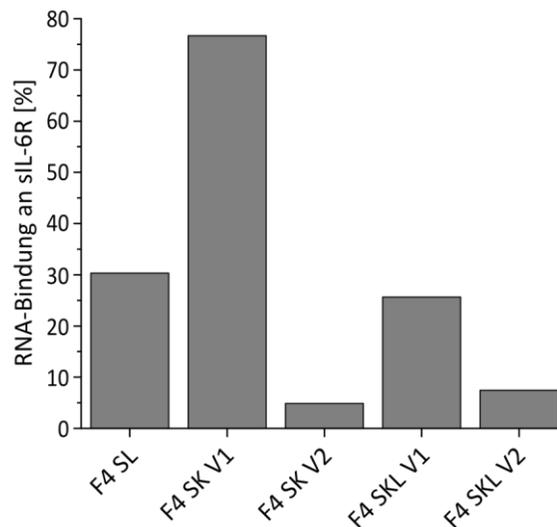


Abbildung 25: Charakterisierung der verkürzten F4 Varianten. Die zu testenden F4-Varianten wurden 5'-terminal ³²P-markiert und mit je 1000 nM Hyper-IL-6 für 20 min bei RT inkubiert. Freie RNA wurde anschließend über eine Nitrozellulosemembran abgetrennt und die relative Signalstärke der gebundenen Fraktion gegenüber einer Pufferkontrolle anhand eines 50%-Signalstandards normiert. Die prozentuale Bindung wurde anschließend in einem Balkendiagramm dargestellt. Im Falle von F4 SK V1 war der 50%-Standard bei der Auswertung bereits überexponiert, weshalb die tatsächliche Signalstärke vermutlich geringer ausfällt als die errechnete.

Ergebnisse

Die Bindungstests mit den verkürzten F4-Varianten zeigten, dass die Minimierung der Aptamere und die Addition einer 5'-Purinsequenz keinen negativen Einfluss auf die Bindung der Oligonukleotide an das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 ausübte. Der Austausch von U9 gegen C und G10 gegen A dagegen führte zu einem deutlichen Rückgang der maximalen Bindung an Hyper-IL-6. F4 SK V1 wurde als kürzeste der getesteten Varianten weiter charakterisiert. Da kein Abfall der Affinität des Aptamers zum sIL-6R beobachtet wurde, wenn die Bindungstests in PBS statt SELEX-Puffer durchgeführt wurden, erfolgten alle nachfolgenden Bindungstests mit F4 (-Varianten) in PBS. Zur Vereinfachung der Nomenklatur wird im folgenden F4 SK V1 als RNA-Aptamer für den Interleukin-6-Rezeptor Domäne 3 (RAID3) bezeichnet. F4 SK V2 wird dementsprechend als RAID3 U9C/G10A bezeichnet. Im Folgenden wurde durch FRA untersucht, ob die Verkürzung von F4 einen Einfluss auf die Dissoziationskonstante des Aptamers ausübte (Abbildung 26).

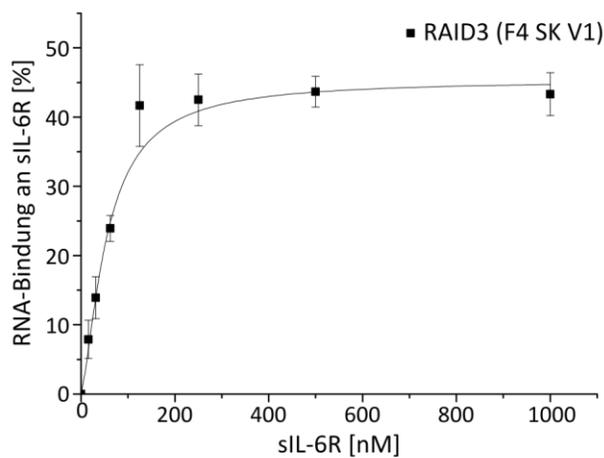


Abbildung 26: Charakterisierung der Affinität von F4 SK V1 (RAID3) zu sIL-6R. Der Anteil Protein-gebundener RNA in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration wurde für RAID3 durch Filterretentionsassay bestimmt. Die in der Grafik dargestellten Messpunkte und Standardabweichungen beruhen auf der Auswertung von je drei unabhängig voneinander hergestellten Verdünnungsreihen. Die Bindungskurve wurde durch mathematische Angleichung mit der Hill1-Gleichung in Origin erstellt.

Der durch FRA ermittelte K_d -Wert für RAID3 ($54,7 \pm 5$ nM) unterschied sich nicht wesentlich von dem des Volllängen-Aptamers F4 ($34,8 \pm 6$ nM). Die Affinität von RAID3 für den sIL-6R konnte mit Atto 647N-markiertem Aptamer durch *micro scale thermophoresis* (MST) bestätigt werden (4.6.3). MST misst die Bewegung fluoreszenzmarkierter Moleküle entlang eines durch einen Laser induzierten Temperaturgradienten. Der durch MST-Messungen ermittelte K_d von RAID3-Atto

Ergebnisse

647N für den sIL-6R betrug 27,7 nM und ist damit sehr nahe an den durch FRA ermittelten Werten (Tabelle 18).

Die Ausbildung des vollständigen putativen Stamms der F4 Aptamere schien, zumindest in der durch die Sekundärstrukturvorhersage suggerierten Konfiguration (Abbildung 24), unwahrscheinlich. Beide getesteten V2-Varianten von F4, in denen die an die Schleife angrenzenden Wobble-Basenpaare durch kanonische Basenpaare ersetzt worden waren, zeigten eine stark reduzierte Bindung an den sIL-6R. Zusammengenommen mit der durch RAID3 und F4 SKL V1 demonstrierten Toleranz für Basenaustausch in größerer Entfernung zur putativen Schleife (Abbildung 24, schwarz hinterlegte Nukleotide) bestand deshalb Anlass zu der Vermutung, dass eine weitere Verkürzung von RAID3 am 5'- sowie am 3'-Terminus möglich sein könnte. Da dieses RNA-Oligonukleotid enzymatisch jedoch schwer zu synthetisieren war, wurde die als RAID3s bezeichnete Verkürzung (Abbildung 24) durch die Firma Biomers über Festphasensynthese synthetisiert. Bindungstests durch FRA mit RAID3s und dem sIL-6R waren jedoch erfolglos. Das weiter verkürzte Aptamer zeigte eine deutlich reduzierte Affinität für den sIL-6R. Es wurde deshalb von einer weiteren Verkürzung von RAID3 abgesehen. Eine Zusammenfassung der Charakterisierung der im Rahmen der Minimierung von F4 erstellten und untersuchten Varianten ist in Tabelle 18 hinterlegt

Tabelle 18: Charakterisierung der Affinität der verkürzten F4-Varianten durch FRA.

Bezeichnung	Länge [nt]	Bindung	K_d [nM]
F4	106	✓	$34,8 \pm 5$
F4 SL	65	✓	n.b.
F4 SKL V1	41	✓	n.b.
F4 SK V1 (RAID3)	34	✓	$54,7 \pm 6$
F4 SKL V2	41	✗	n.b.
F4 SK V2 (RAID3 U9C/G10A)	34	✗	n.b.
RAID3s	25	✗	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

5.3.3 Bioinformatische Evaluation möglicher G-Quadruplexe in RAID3

Aufgrund des hohen Guaninanteils von F4, insbesondere im Bereich der putativen Schleife, wurde die Sequenz neben der Sekundärstrukturvorhersage auch durch das webbasierte Programm *QGRS-mapper*¹⁶⁵ untersucht. *QGRS-mapper* ermöglicht die Vorhersage des Potentials G-reicher

Ergebnisse

Nukleinsäuremoleküle, G-Quadruplexe zu bilden. Diese Struktur motive werden durch zwei oder mehr Guanin-Tetraden gebildet, wobei jeweils ein Guanin durch Hoogsten-Basenpaarung mit zwei benachbarten Guaninen interagiert (Abbildung 27).¹⁶⁶

Stabilisiert werden G-Quadruplexe durch einwertige Kationen, Kalium oder Natrium, die die Carbonylgruppe der Guanine im Zentrum der G-Tetrade koordiniert^{166,167}. Die Formation eines G-Quadruplexes kann deshalb Kalium-abhängig durch Auswertung von CD-Spektren nachvollzogen werden.

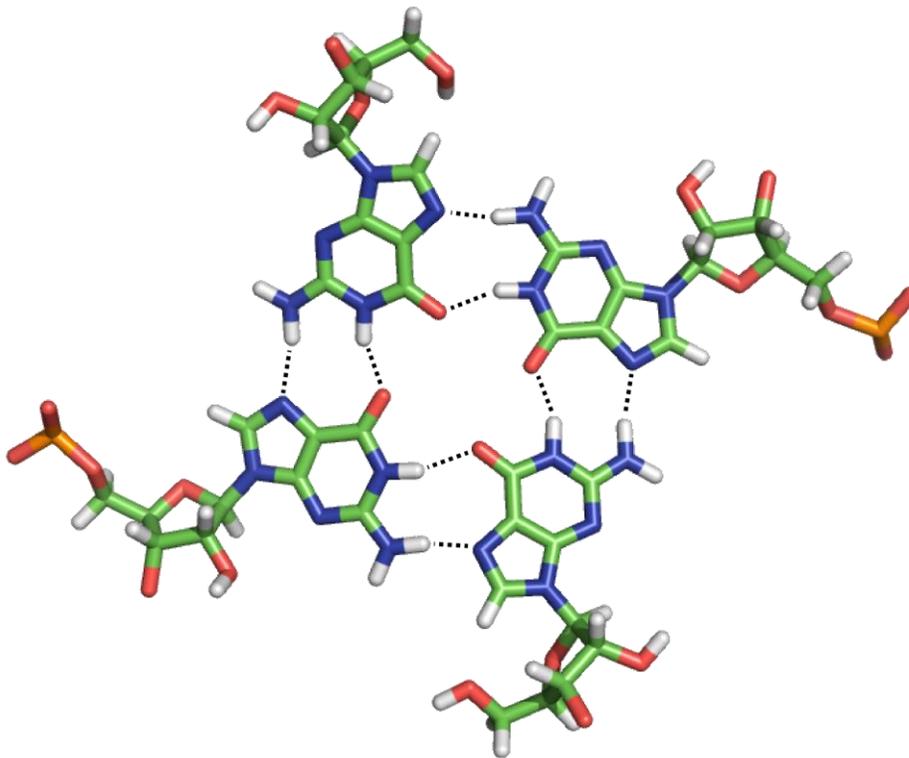


Abbildung 27: G-Tetrade des TERRA RNA-Quadruplexes. PDB-id: 2M18. Wasserstoffbrücken zwischen den Guaninen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die Analyse von F4 durch *GQRS-mapper* erbrachte 54 überlappende, potentielle G-Quadruplexe mit variierenden Wahrscheinlichkeitswertungen (*G-Score*). Ein G-Quadruplex, der durch zwei G-Tetraden gebildet wird, kann dabei maximal einen *G-Score* von 21 erreichen. Alle vorgeschlagenen Möglichkeiten bezogen mindestens drei GpG-Paare der putativen Schleife mit ein. Nach Abschluss der Verkürzung wurde RAID3 ebenfalls durch *GQRS-mapper* untersucht. Die 5'-terminalen Guanine (⁺¹GGG⁺³) wurden nicht in die Prognose mit einbezogen, da es für sie keine

Ergebnisse

direkte Entsprechung an den korrespondierenden Positionen im Vollängen-Aptamer gab. Die Bildung eines zu F4 strukturell äquivalenten G-Quadruplexes sollte also unabhängig von den für die T7-Transkription essentiellen Guaninen am 5'-Terminus erfolgen. Eine Übersicht der potentiell durch RAID3 gebildeten G-Quadruplexe ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Putative G-Quadruplexe in RAID3 nach mFOLD-Vorhersage.

Position	Länge [nt]	Sequenzabschnitt	G-Score
12	15	<u>GGGAGUGGAGGGUGG</u>	18
12	15	<u>GGGAGUGGAGGGUGG</u>	18
12	19	<u>GGGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	16
12	19	<u>GGGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	18
12	19	<u>GGGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	18
12	19	<u>GGGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	16
12	19	<u>GGGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	14
13	14	<u>GGAGUGGAGGGUGG</u>	19
13	14	<u>GGAGUGGAGGGUGG</u>	19
13	18	<u>GGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	16
13	18	<u>GGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	18
13	18	<u>GGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	18
13	18	<u>GGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	17
13	18	<u>GGAGUGGAGGGUGGAUGG</u>	15
18	13	<u>GGAGGGUGGAUGG</u>	20
18	13	<u>GGAGGGUGGAUGG</u>	20

Die Prognose durch *QGRS-mapper* zeigte drei übergeordnete Topologien für alternative G-Quadruplexe mit untergeordneter Ambiguität für die stapelausbildenden Guanine. Für jede der drei alternativen Topologien wurden durch *QGRS-mapper* Varianten mit sehr hohem *G-Score* vorausgesagt (siehe Tabelle 19). Eine Übersicht der drei möglichen Topologien ist in Abbildung 28 dargestellt.

Ergebnisse

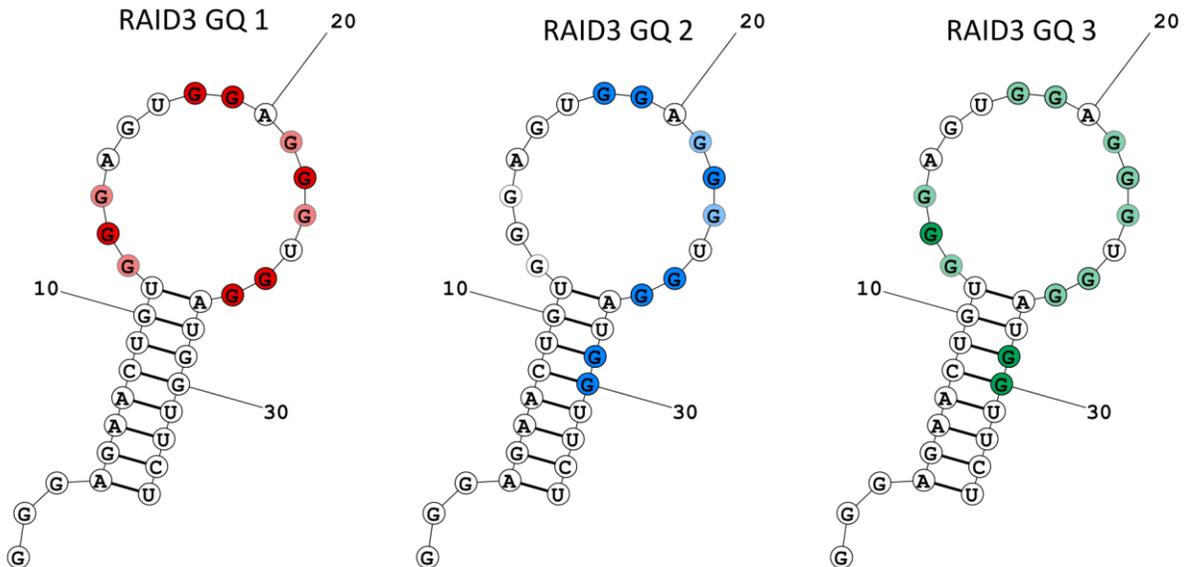


Abbildung 28: QGRS-mapper-Prognose möglicher G-Quadruplex-Topologien für RAID3. Die Analyse der RAID3 Sequenz durch *QGRS-mapper* zeigte drei potentielle Topologien für G-Quadruplexe (GQ 1-3). Die 5'-terminalen Guanine wurden nicht in die Prognose mit einbezogen, da es für sie keine Entsprechungen im unverkürzten Ausgangs-Aptamer F4 gab. Stapelbildende Guanine wurden farblich hervorgehoben; Guanine, die nicht Teil aller Varianten einer jeweiligen Topologie waren, wurden mit reduzierter Farbdeckung dargestellt.

Alle drei prognostizierten G-Quadruplex-Topologien schließen die putative Schleife in ihrer Gesamtheit (GQ 1 und 3) oder zum Teil (GQ 2) mit ein (Abbildung 28). Unterschiedliche Varianten der jeweiligen Topologien ergeben sich aus dem Vorhandensein von drei aufeinanderfolgenden Guaninen und der daraus resultierenden Ambiguität für potentiell stapelbildende Guanine. Die meisten Freiheitsgrade für potentiell am G-Quadruplex beteiligte Guanine weist GQ 3 auf (Abbildung 28). GQ 2 weist mit 20 den höchsten G-score der möglichen RAID3-Varianten auf und liegt damit nahe an dem maximal möglichen Wert von 21 für Zwei-Stapel-G-Quadruplexe. Diese Topologie schließt G29 und G30 mit ein. Da diese in der Sekundärstrukturvorhersage an der Ausbildung des Stammes beteiligt sind, würde GQ 2 also eine alternative Sekundärstruktur des Aptamers voraussetzen.

Der experimentelle Nachweis für diese Hypothese sollte im Folgenden durch Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie erfolgen.

Ergebnisse

5.3.4 Untersuchung des Circulardichroismus von RAID3

Zirkular polarisiertes Licht wird von optisch aktiven, chiralen Molekülen in Abhängigkeit der Drehrichtung unterschiedlich stark absorbiert. Die Amplitude der abweichenden Absorption erlaubt Rückschlüsse auf Strukturelemente innerhalb des untersuchten Moleküls. Die für RNA charakteristischen, parallelen G-Quadruplexe weisen ein Maximum bei 265 nm und ein Minimum bei 240 nm Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes in ihrem CD-Spektrum auf^{166,168}. Neben dem charakteristischen Spektrum besteht für die Formation von G-Quadruplexen eine Abhängigkeit von einwertigen Kationen, die sich zwischen Guaninstapel einlagern. Kalium ist aufgrund seines Ionenradius besonders geeignet, einen G-Quadruplex zu stabilisieren. Für die Untersuchung von RAID3 wurden deshalb CD-Spektren (4.6.5) in TRIS-Puffer vor und nach der Zugabe von KCl mit einer Endkonzentration von 10 mM aufgenommen. Neben dem sIL-6R-bindenden RAID3 sollte auch die nicht-bindende Variante RAID3U9C/G10A untersucht werden.

Als Negativkontrolle für die Formation eines G-Quadruplexes wurde AIR-1A verwendet. AIR-1A weist eine konvergente 19 nt Sequenz zum IL-6R bindenden Aptamer AIR-3A¹⁵⁰ auf (3.7.3, Abbildung 29), verliert in seiner verkürzten Form jedoch die Fähigkeit, den sIL-6R zu binden.

```
AIR-3A: 5' -GGGGAGGCUGUGGUGAGGG-3'  
AIR-1A: 5' -GGGGUGGCUGUGGUGUGGG-3'
```

Abbildung 29: Sequenzvergleich AIR-3A und AIR-1A.

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass nur AIR-3A in Anwesenheit von Kalium einen G-Quadruplex ausbildet. AIR-1A zeigte dagegen keine Kalium-abhängige Änderung seines CD-Spektrums.

Ergebnisse

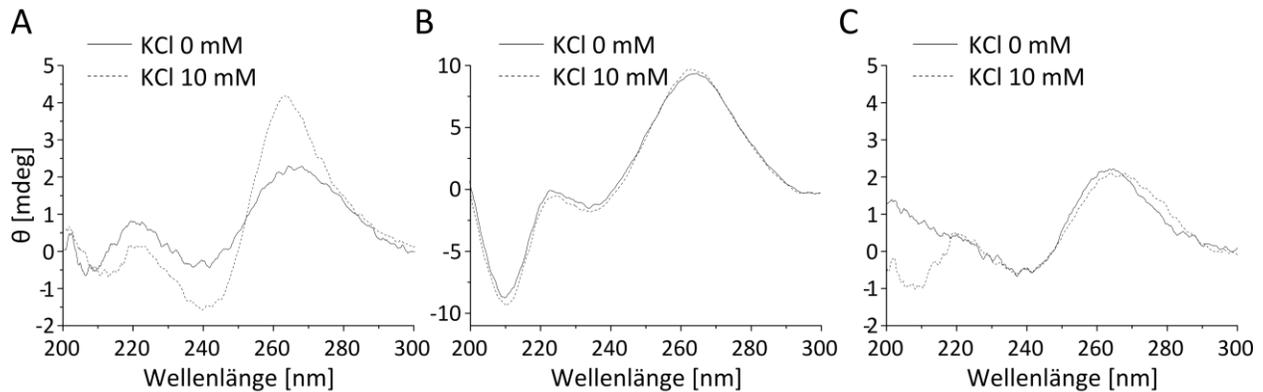


Abbildung 30: CD-Untersuchung von RAID3. Für die Aufnahme der CD-Spektren wurden je 5 μ M RNA in 50 mM TRIS pH 7,4 aufgenommen und vor sowie nach der Zugabe von KCl in einem Jasco J-815 CD-Spektrometer vermessen. Der Mittelwert von je zehn Spektren pro Pufferbedingung und Probe wurde nach der Normierung der Werte mit den entsprechenden Pufferkontrollen in Origin graphisch dargestellt. (A) RAID3, (B) RAID3 U9C/G10A, (C) AIR-1A.

Das CD-Spektrum von RAID3 in TRIS pH 7,4 und mit 10 mM KCl (Abbildung 30) zeigte den für einen parallelen G-Quadruplex charakteristischen Verlauf mit einem Maximum bei 265 nm und einem Minimum bei 240 nm. Die Formation der optisch aktiven Topologie von RAID3 war zudem Kalium-abhängig.

Interessanterweise wurden deutliche Unterschiede zwischen den CD-Spektren von RAID3 und RAID3 U9C/G10A festgestellt. Die Amplitude der Maxima und Minima war im Falle von RAID3 U9C/G10A deutlich größer, es konnte jedoch keine Kalium-Abhängigkeit des Kurvenverlaufs festgestellt werden. Das Maximum bei 265 nm sowie die zwei Minima bei 235 nm und 210 nm deuten auf die Formation von A-Form Duplex-RNA hin¹⁶⁹. Im CD-Spektrum von RAID3 konnten dagegen keine deutlichen Hinweise für das Auftreten von Duplex-RNA festgestellt werden. Die Abweichenden CD-Spektren von RAID3 und RAID3 U9C/G10A könnten deshalb Hinweise auf eine unterschiedliche Faltung der beiden F4-Varianten bedeuten.

Für AIR-1A wurde erwartungsgemäß keine Kalium-abhängige Änderung des CD-Spektrums beobachtet. Der Kurvenverlauf glich unter beiden Bedingungen weitestgehend dem von RAID3 vor der Zugabe von KCl.

5.3.5 SAXS-Messungen und Erstellung eines molekularen Modells von RIAD3

Durch Prof. Dr. Martin Zacharias (Technische Universität München) wurde ein Model von RAID3 auf Basis des putativen G-Quadruplexes GQ2 (Abbildung 28) und eines terminalen, vier

Ergebnisse

Basenpaare umfassenden Stammes durch Biomolekulare-Dynamik-Simulationen erstellt. *Small Angle X-ray Scattering*-(SAXS)-Messungen von RAID3 durch Katharina Berg (Universität Hamburg) und Erica Valentini (EMBL-Hamburg) zeigten eine Struktur mit einem Gyrationradius von 2,7 nm und einem maximalen Durchmesser von 10 nm. Das daraus resultierende Molekulargewicht von 26 kDa würde einem RAID3-Dimer entsprechen. Der Fit des durch Prof. Dr. Martin Zacharias erstellten Modells wies mit χ^2 -Wert von 0,906 eine geringe Diskrepanz zur SAXS-Struktur auf¹⁷⁰. Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurde RAID3 nur auf die Fähigkeit untersucht, rekombinanten, humanen sIL-6R zu binden. In den folgenden Versuchen sollte aufgeklärt werden, ob das Aptamer den IL-6R auch in seiner zellgebundenen Form bindet.

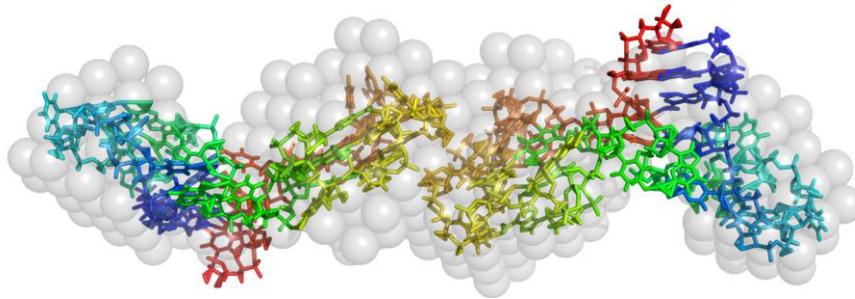


Abbildung 31: Fit des durch Prof. Dr. Martin Zacharias erstelltes Model von RAID3 in die durch SAXS bestimmte Struktur. Für das Model kam eine modifizierte Version des JUMNA-Programmes in Kombination mit dem Amber 4.1 *force field* zum Einsatz¹⁷¹⁻¹⁷³. Als Grundlage für die Modellierung wurde die Sequenz 5'-AGAACUGUGGGAGUGGAGGGUGGAUGGUU-3' von RAID3 unter Auslassen der ersten drei Guanine verwendet. Der G-Quadruplex selbst wurde auf Basis der publizierten Struktur eines RNA-Quadruplexes (PDB-id: 1My9)¹⁷⁴ und dem Sequenzbereich mit dem höchsten G-Score (5'-GGAGGGUGGAUGG-3') berechnet. Für eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens siehe Mittelberger *et. al.*¹⁷⁰.

5.4 Charakterisierung der RAID3-Bindung an IL-6R präsentierende BaF3-Zellen

Der IL-6R tritt *in vivo* sowohl als löslicher als auch zellgebundener Rezeptor auf. Obwohl beide Formen zur Vermittlung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion befähigt sind, unterscheiden sie sich in ihren physiologischen und pharmakologischen Rollen. Die klassische IL-6-Signaltransduktion über zellgebundenen IL-6R ist auf Zellen beschränkt, die selbst IL-6R präsentieren. Der sIL-6R ermöglicht dagegen durch das sogenannte *Trans-Signalling* die IL-6-abhängige Aktivierung von Zellen, die den Rezeptor selbst nicht präsentieren⁷⁰.

Ergebnisse

Um die IL-6R-abhängige Bindung von RAID3 an Zellen nachzuweisen, wurde Atto 647N markiertes Aptamer (RAID3-Atto 647N) durch die Firma Biomers synthetisiert. Alle Untersuchungen der Aptamer-Interaktion mit BaF3-Zellen wurden unter Verwendung von PBS/BSA (1 mg/mL BSA) durchgeführt (4.8). Die verwendete murine Prä-B-Zelllinie BaF3 war stabil mit der cDNA des humanen gp130, IL-6R sowie TNF-alpha (BaF3/gp130/IL-6R/TNF) transfiziert worden. Als Kontrolle wurden BaF3-Zellen verwendet, die nur mit humanem gp130 transfiziert worden waren (BaF3/gp130). Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Athena Chalaris (Institut für Biochemie, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel) bereitgestellt.

5.4.1 Mikroskopische Untersuchung der RAID3-Bindung an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen

Konfokale *Laser Scanning Microscopy* (LSM) ermöglicht den direkten Nachweis der Interaktion von fluoreszenzmarkierten Aptameren und Zellen. Das Abrastern des Präparats durch einen fokussierten Laserstrahl erlaubt zudem eine räumliche Auflösung der Fluoreszenz und somit die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der markierten Aptamere. Die Vorbereitung der Zellen für die mikroskopische Analyse ist in Kapitel 4.8/4.8.1 hinterlegt. Als Positivkontrolle für die IL-6R-abhängige Bindung der Aptamere wurde Atto 647N markiertes AIR-3A (AIR-3A-Atto 647N) verwendet. Eine Atto 647N-markierte, einzelsträngige RNA (*single stranded control RNA*, sscRNA-Atto 647N) wurde als Negativkontrolle verwendet. Zunächst wurde die Bindung der RNAs an die BaF3-Zellen nach 30 min Inkubation bei 37 °C in PBS/BSA unter dem Mikroskop untersucht.

Ergebnisse

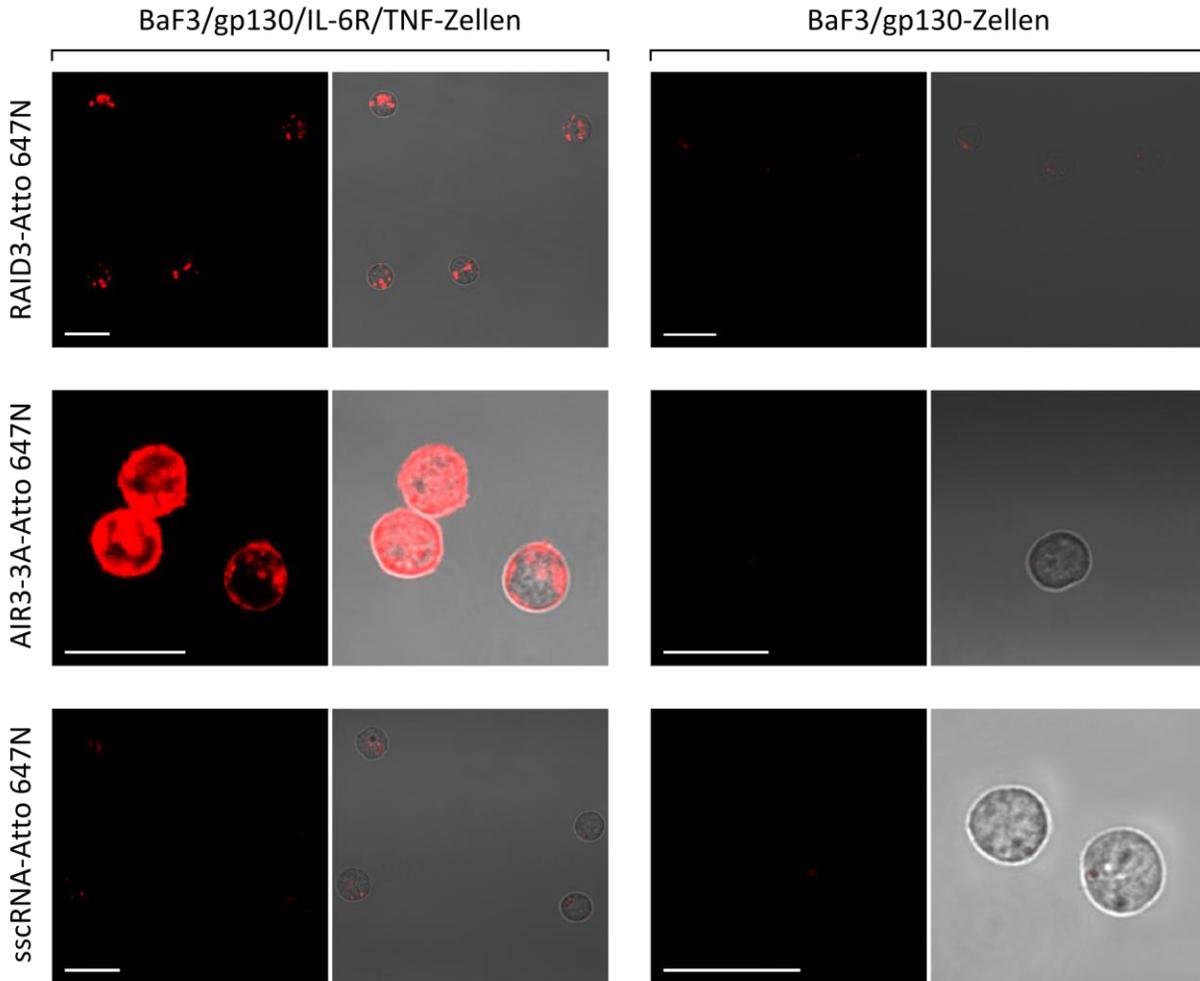


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der IL-6R-abhängigen Interaktion von RAID3 mit BaF3-Zellen. Die BaF3-Zellen wurden 2x mit PBS/BSA gewaschen und je 100.000 Zellen wurden anschließend für 30 min in PBS/BSA bei 37 °C mit der entsprechenden, Atto 647N-markierten RNA inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen RNA wurden die Proben abgedunkelt bei 4 °C bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Aufnahmen wurden mit folgenden Einstellungen für das LSM gemacht: HeNe Laser (633 nm), 5–15% Laseremissionsstärke, 260 µm „Pinhole“-Durchmesser, Strahlteiler: HFT514/633 nm und NFT 545 nm, LP 650 nm Filter. Der verwendete Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen zeigten deutliche Fluoreszenz nach Inkubation mit dem IL-6R-D3-bindenden RAID3-Atto 647N. Die beobachteten Fluoreszenzsignale für RAID3-Atto 647N zeigten eine deutliche Lokalisation im Bereich der Zellen (Abbildung 32). Die subzelluläre Lokalisation war auf kompartimentierte Bereiche im Cytoplasma der Zellen beschränkt.

BaF3/gp130-Zellen zeigten nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N vereinzelt ebenfalls schwache Fluoreszenzsignale. Im Vergleich zu den BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen war die

Ergebnisse

Fluoreszenzintensität der nicht IL-6R-präsentierenden BaF3/gp130-Zellen nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N jedoch deutlich niedriger.

Der Nachweis von IL-6R auf der Oberfläche der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen erfolgte durch das gut charakterisierte RNA-Aptamer AIR-3A. Die Inkubation der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen mit AIR-3A-Atto 647N resultierte in einer deutlichen Fluoreszenz der Zellen. Obwohl beide Aptamere, RAID3 und AIR-3A, IL-6R abhängig an die BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen banden und die Zellen erst vor Inkubation mit den Aptameren auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt wurden, konnten Unterschiede in der Signalstärke der Fluoreszenz beobachtet werden. IL-6R-präsentierende Zellen, die mit AIR-3A-Atto 647N inkubiert worden waren, zeigten eine deutlich höhere Fluoreszenz als solche, die mit RAID3-Atto 647N inkubiert worden waren. Auch in der Lokalisation der Fluoreszenz konnten Unterschiede zwischen beiden Aptameren festgestellt werden. Anders als RAID3-Atto 647N schien sich AIR-3A-Atto 647N zum größten Teil auf der Oberfläche der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen zu befinden.

Es konnten darüber hinaus jedoch auch für BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nach Inkubation mit AIR-3A-Atto 647N fluoreszenzmarkierte Kompartimente im Zellinneren beobachtet werden. Diese erschienen phänotypisch identisch zu denen, die in IL-6R-präsentierenden Zellen nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N beobachtet worden waren (Abbildung 32). Die sscRNA-Atto 647N führte lediglich zu einer schwachen Fluoreszenz nach Inkubation mit BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen.

Um die Hypothese einer interzellulären Lokalisation von RAID3-Atto 647N nach Inkubation mit den BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen zu überprüfen, sollte an der Zelloberfläche befindliche RNA degradiert werden. Zum diesem Zweck wurden die BaF3-Zellen nach 10 min Inkubation in PBS/BSA bei 37 °C mit Atto 647N-markierter RNA gewaschen und für 20 min bei 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; DMEM/10% FKS) aufgenommen. Durch die Abundanz von Nukleasen im Serum sollte zum einen die schnelle Hydrolyse der RNAs gewährleistet, gleichzeitig aber die Vitalität der Zellen durch die Verwendung von Vollmedium nicht kompromittiert werden. Die Halbwertszeit polymerer RNA in serumhaltigem Medium beträgt für gewöhnlich nur wenige Sekunden¹²⁹, weshalb auf der Oberfläche der Zellen lokalisierte Aptamere durch diese Behandlung rasch abgebaut und nur Fluoreszenzsignale von bereits internalisierten Aptameren erhalten bleiben sollten. Nach der

Ergebnisse

Inkubation mit den Atto 647N-markierter RNA wurden die Zellen mikroskopisch analysiert (Abbildung 33).

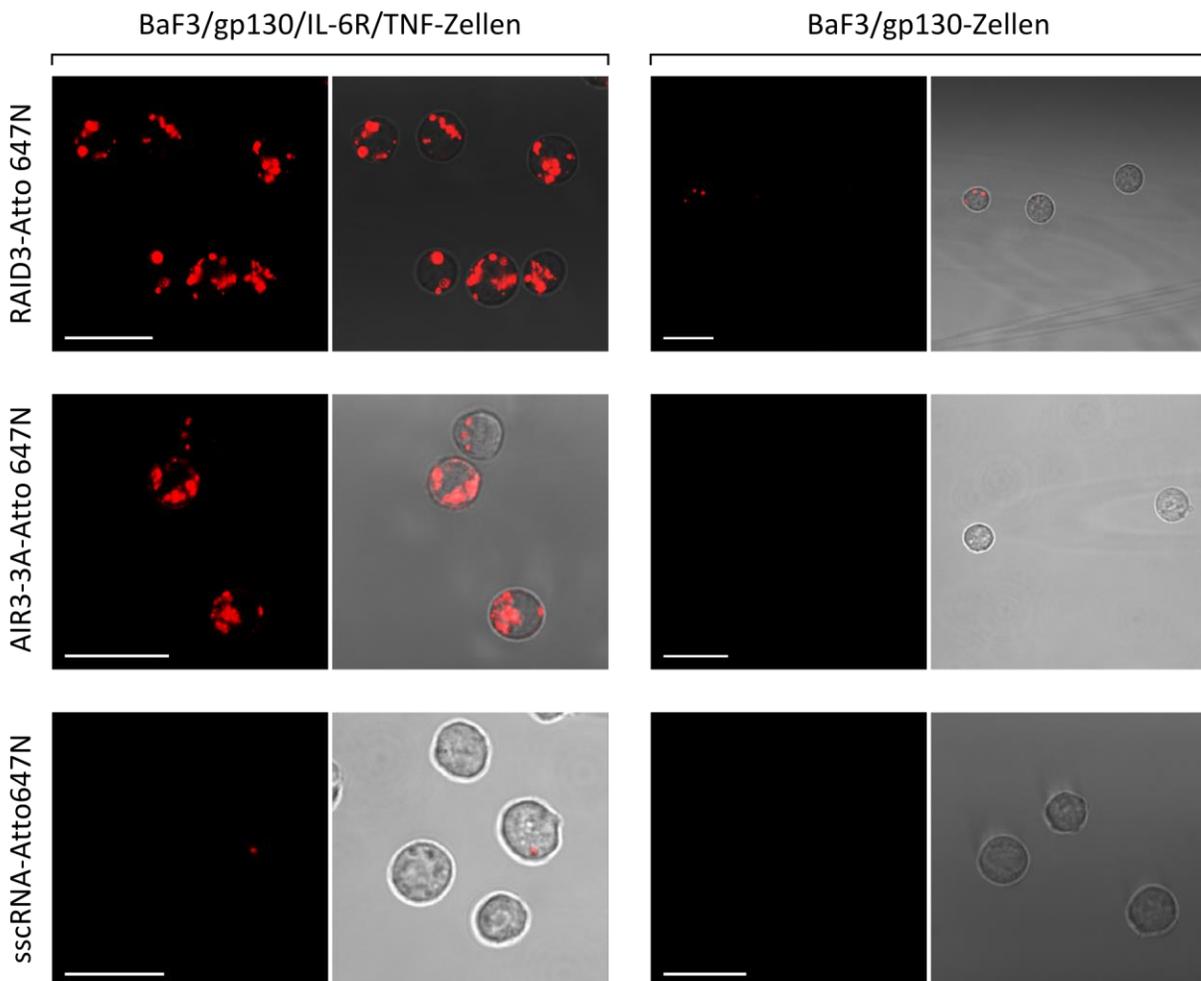


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der IL-6R-abhängigen Interaktion von RAID3 mit BaF3-Zellen nach DMEM/10% FKS Behandlung. Die BaF3-Zellen wurden 2x mit PBS/BSA gewaschen und je 100.000 Zellen wurden zunächst für 10 min in PBS/BSA mit der entsprechenden, Atto 647N-markierten RNA inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 1000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen anschließend 20 min in DMEM/10% FKS bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abgedunkelt bei 4 °C bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Aufnahmen wurden mit folgenden Einstellungen für das LSM gemacht: HeNe Laser (633 nm), 5–15% Laseremissionsstärke, 260 µm „Pinhole“-Durchmesser, Strahlteiler: HFT514/633 nm und NFT 545 nm, LP 650 nm Filter. Der verwendete Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Behandlung mit DMEM/10% FKS hatte keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Lokalisation oder Signalstärke der Fluoreszenz der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N (Vergleiche Abbildung 32 und Abbildung 33). Anders verhielt es sich für BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen, die mit AIR3-3A-Atto 647N inkubiert und anschließend DMEM/10%

Ergebnisse

FKS behandelt wurden. Während die Fluoreszenz nach Inkubation der Zellen mit dem Aptamer in PBS/BSA größtenteils auf der Zelloberfläche detektiert wurde, war sie nach der Inkubation der Zellen in serumhaltigem Medium ebenfalls auf Kompartimente innerhalb der Zelle beschränkt.

Die Fluoreszenzunterschiede zwischen den BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N bzw. AIR-3A-Atto 647N in PBS/BSA (Abbildung 32) waren nach der Behandlung mit DMEM/10% FKS nicht mehr feststellbar (Abbildung 33). Sowohl Lokalisation als auch Fluoreszenzintensität waren bei beiden Aptameren scheinbar gleich. Da die Internalisierung von AIR-3A bereits gut untersucht ist¹⁵⁰, wurde daraus auf die IL-6R-abhängige Aufnahme von RAID3 durch die BaF3-Zellen geschlossen.

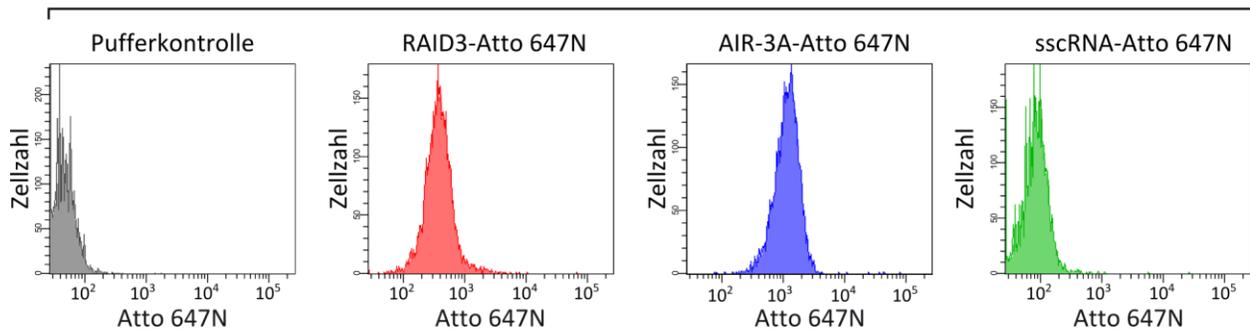
Die LSM-Analyse erlaubt vor allem die qualitative Charakterisierung der Interaktion zwischen fluoreszenzmarkierten Aptameren und Zellen. Um auch quantitative Aussagen über die Bindung von RAID3 an die BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen treffen zu können, wurde deshalb im Folgenden auf ein Durchflusszytometer zurückgegriffen.

5.4.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der RAID3-Bindung an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen

Die Quantifizierung der RAID3-Atto 647N-Bindung an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. AIR-3A-Atto 647N wurde als Positivkontrolle für die IL-6R abhängige Aptamerbindung an die BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen eingesetzt. Die RNA sscRNA-Atto 647N diente als Negativkontrolle, um die Spezifität der Aptamer-Bindung an die verwendeten BaF3-Zellen zu verifizieren. Die Probenvorbereitung ist in Kapitel 4.8/4.8.2 beschrieben. Die Zellen wurden zunächst nach Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC und SSC) des Lichts des blauen Lasers ausgewählt, um nur die Fluoreszenz vitaler Zellen zu berücksichtigen, und je 10.000 Ereignisse ausgewertet.

Ergebnisse

BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen



BaF3/gp130-Zellen

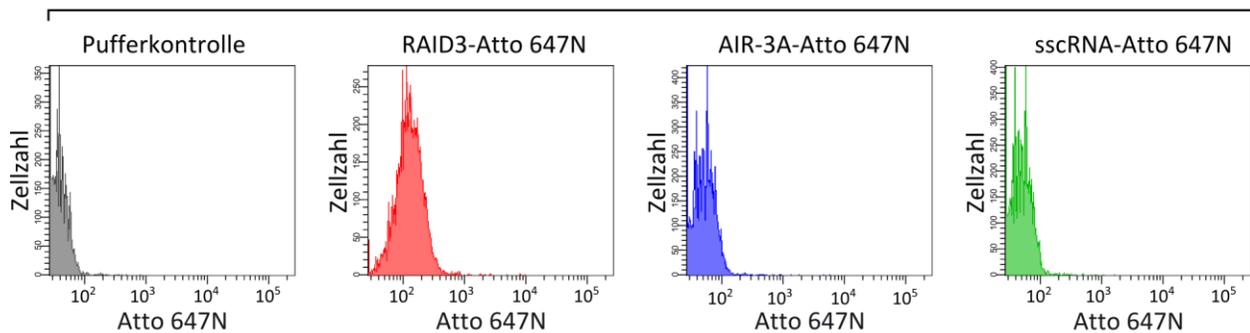


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Untersuchung der IL-6R-abhängigen Interaktion von RAID3 mit BaF3-Zellen. Die BaF3-Zellen wurden 2x mit PBS/BSA gewaschen und je 100.000 Zellen wurden anschließend für 30 min in PBS/BSA bei 37 °C mit den entsprechenden, Atto 647N-markierten RNAs inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen RNAs wurden die Proben abgedunkelt bei 4 °C bis zur Untersuchung aufbewahrt. Alle Messungen wurden bei konstanter *Photomultiplier Tube* (PMT)-Spannung für FSC, SSC und dem 660 nm Detektor durchgeführt.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der RAID3-Atto 647N-Bindung an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen (Abbildung 34) spiegelten die Befunde der mikroskopischen Untersuchung wieder. Im Vergleich zur Negativkontrolle sscRNA-Atto 647N zeigten IL-6R-präsentierende Zellen eine deutliche erhöhte Fluoreszenz. Die Bindung von RAID3-Atto 647N an die BaF3/gp130 fiel deutlich geringer aus, wenn auch eine erhöhte Signalintensität im Vergleich zur sscRNA-Atto647N-Kontrolle beobachtet werden konnte.

Die hohe Signalintensität der mit AIR-3A-Atto 647N inkubierten BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen (Abbildung 34) steht ebenfalls in Einklang mit den Beobachtungen der mikroskopischen Experimente und lässt sich vermutlich auf den hohen Anteil an AIR-3A-Atto 647N auf der Zelloberfläche zurückführen.

Ergebnisse

Aus den Untersuchungen am LSM ging hervor, dass RAID3-Atto 647N anscheinend nur internalisiert mit den IL-6R-präsentierenden BaF3-Zellen assoziiert war (Abbildung 32 und Abbildung 33). Da die Internalisierungsrate für Zelloberflächenproteine temperaturabhängig ist, sollte am FACS untersucht werden, ob die Fluoreszenzintensität der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen geringer ausfällt, wenn die Inkubation mit RAID3-Atto 647N bei Raumtemperatur statt bei 37 °C durchgeführt wird. Die Parameter wurden für alle Messungen konstant gehalten, um vergleichbare Messwerte zu erhalten.

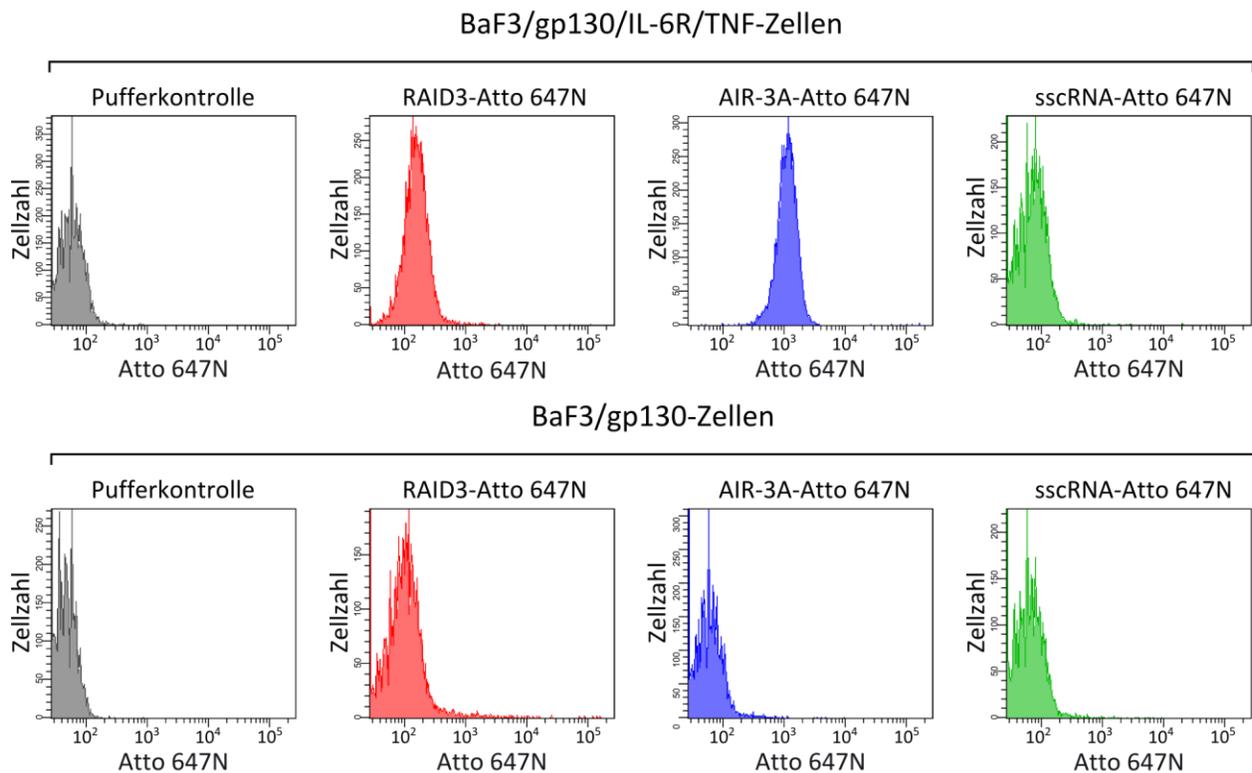


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Untersuchung der IL-6R-abhängigen Interaktion von RAID3 mit BaF3-Zellen. Die BaF3-Zellen wurden 2x mit PBS/BSA gewaschen und je 100.000 Zellen wurden anschließend für 30 min in PBS/BSA bei Raumtemperatur mit der entsprechenden, Atto 647N-markierten RNA inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen RNA wurden die Proben abgedunkelt bei 4 °C bis zur Untersuchung aufbewahrt. Alle Messungen wurden bei konstanter PMT-Spannung für FSC, SSC und den 660 nm Detektordurchgeführt.

Die Inkubation mit RAID3-Atto 647N bei RT (Abbildung 35) führte im Vergleich zur Inkubation bei 37 °C zu einer deutlichen Verringerung der Fluoreszenzintensität der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen. Die Mediane der Atto 647N-Fluoreszenz von je drei unabhängigen Messungen nach

Ergebnisse

Inkubation bei RT und 37 °C wurde in einem Balkendiagramm aufgetragen, um einen direkten Vergleich der ermittelten Messwerte zu ermöglichen.

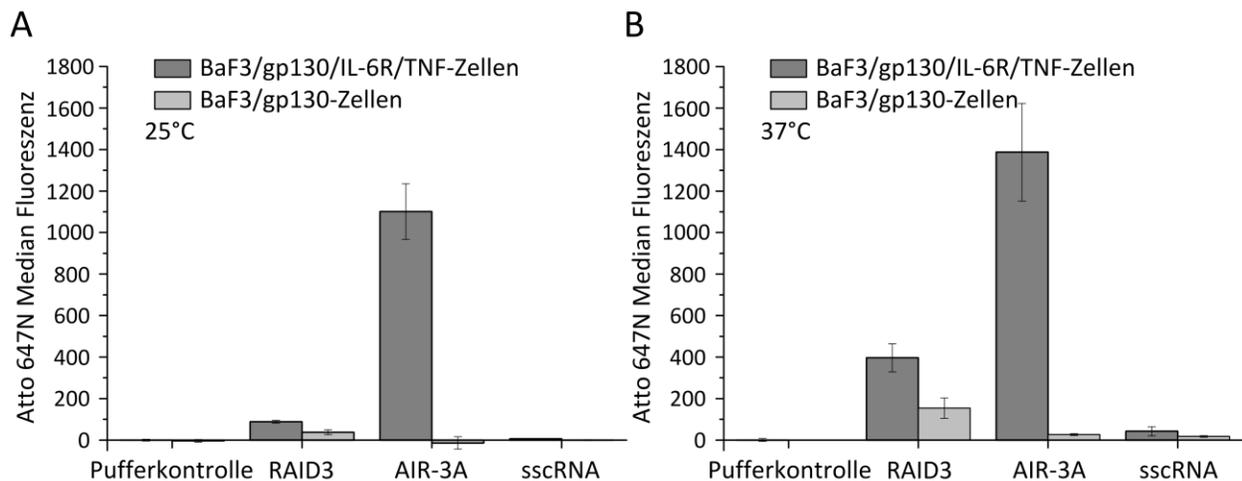


Abbildung 36: Quantifizierung der IL-6R-abhängigen Bindung von RAID3 an BaF3-Zellen. Der Median der Fluoreszenz der BaF3-Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden Atto 647N-markierten RNAs wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Es wurden jeweils die Mittelwerte dreier Messungen nach Normierung mit der Pufferkontrolle verwendet. (A) Fluoreszenz der BaF3-Zellen nach Inkubation mit Atto 647N-markierter RNA bei RT. (B) Fluoreszenz der BaF3-Zellen nach Inkubation mit Atto 647N-markierter RNA bei 37 °C

Die Darstellung der Fluoreszenz-Mediane verdeutlicht den bereits beobachteten Trend. Die Fluoreszenz der BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen vervierfachte sich nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N bei 37 °C in Relation zur Inkubation bei RT. Demgegenüber zeigte die Fluoreszenz der Zellen mit AIR-3A-Atto647N nur eine Zunahme um den Faktor 1,25 (Abbildung 36).

Die Fluoreszenz bei BaF3/gp130-Zellen mit RAID3-Atto647N zeigte allerdings ebenfalls eine deutliche Zunahme, hier lag der Faktor ebenfalls bei 4. Die absoluten Fluoreszenzwerte waren jedoch deutlich geringer (Abbildung 36).

Alle bisher durchgeführten Zellversuche fanden unter Verwendung von PBS/BSA statt, da Medium, insbesondere serumhaltiges Medium, zu einer schnellen Hydrolyse von RNA führt. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich RAID3 postselektiv gegenüber Serum-RNAsen stabilisieren lässt.

Ergebnisse

5.5 Postselektive Modifikation von RAID3

Die Halbwertszeit von RNA in biologischen Flüssigkeiten ist in der Regel sehr kurz. Die Abundanz von Viren mit RNA-Genomen und der daraus resultierende Selektionsdruck haben zur Evolution einer Vielzahl äußerst aktiver und stabiler RNAsen geführt¹⁷⁵. Entsprechend schwierig ist die Anwendung von RNA-Aptameren außerhalb Nuklease-freier Puffersysteme. Der Einsatz modifizierter Nukleotide hat sich als wirkungsvolle Methode etabliert, dieses Problem zu überwinden. Im Speziellen die Modifikation der 2'-OH Gruppe von Pyrimidinen resultiert in einem effizienten Schutz gegen Endonukleasen wie RNase A. Besonders 2'-Desoxy-2'-fluor-pyrimidine (2'-F-Py) haben sich für die Stabilisierung von RNA-Aptameren bewährt, da sie nicht nur weitgehenden Schutz gegen RNase A vermitteln, sondern auch enzymatisch durch die T7-RNA-Polymerasevariante Y639F in polymere RNA eingebaut werden können¹³¹.

Im Folgenden sollte die Möglichkeit einer postselektiven Verkürzung von F4 bzw. RAID3 näher überprüft werden.

5.5.1 2'-F Modifikation von F4 SL, SKL und RAID3

Für die Modifikation mit 2'-F-Pyrimidinen wurden zunächst die relativ leicht zu transkribierenden F4-Varianten F4 SL und SKL ausgewählt. Die Bindung der Aptamere wurde durch FRA mit 1000 nM Hyper-IL-6 getestet.

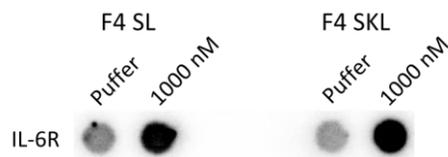


Abbildung 37: FRA mit 1000 nM Hyper-IL-6 und den 2'-F-pyrimidinmodifizierten F4 Varianten F4 SL und F4 SKL. Die 2'-F-modifizierten F4-Varianten SL und SKL wurden über FRA auf Bindung an 1000 nM Hyper-IL-6 in PBS untersucht. Als Kontrolle wurde die 2'-F-modifizierte RNA ohne Protein in PBS inkubiert.

Durch den FRA konnte gezeigt werden, dass beide F4-Varianten auch nach Austausch aller Pyrimidine gegen die korrespondierenden 2'-F-Nukleotide weiterhin in der Lage waren, Hyper-IL-6 zu binden. Die modifizierten Nukleotide schienen demnach keine negative Auswirkung auf die korrekte Faltung der Aptamere zu haben.

Ergebnisse

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt deshalb mit der Charakterisierung der 2'-F-Py-modifizierten F4-Variante RAID3 begonnen. Dabei sollte nicht nur die Bindung des 2'-F-Py-Aptamer an den sIL-6R verifiziert, sondern auch dessen Dissoziationskonstante bestimmt werden. Als Kontrolle wurde die 2'-F-Py-modifizierte F4-Variante RAID3U9C/G10A verwendet.

Die Untersuchung des unmodifizierten RAID3U9C/G10A durch CD-Spektroskopie zeigte, dass die U9C/G10A-Doppelvariante zu einer alternativen Faltung der RNA führte (Abbildung 30), durch die das Oligonukleotid nicht mehr in der Lage war, den sIL-6R zu binden. Die Bindung von RAID3 2'-F-Py und RAID3 U9C/G10A 2'-F-Py an den sIL-6R wurden durch FRA charakterisiert.

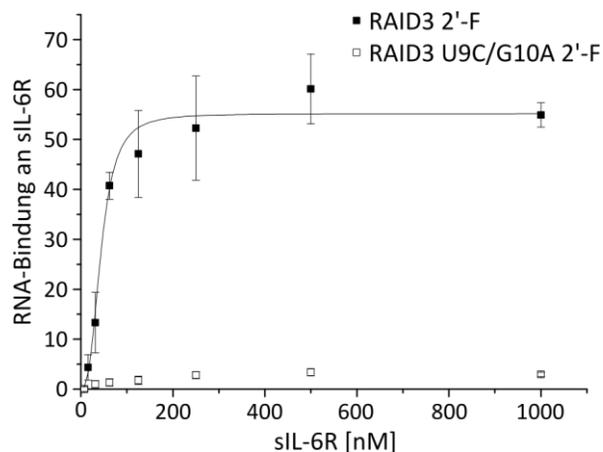


Abbildung 38: Untersuchung der Affinität von RAID3 2'-F für den sIL-6R. Der Anteil Protein-gebundener 2'-F RNA in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration wurde für RAID3 durch Filterretentionsassays bestimmt. Die in der Grafik dargestellten Messpunkte und Standardabweichung beruhen auf der Auswertung von je drei unabhängig voneinander hergestellten Verdünnungsreihen. Zwei Ausreißer (nahe 100% Bindung) bei einer der Verdünnungsreihen für die Spots bei 500 und 250 nM Proteinkonzentration wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Als Negativkontrolle wurde 2'-F-modifiziertes RAID3 U9C/G10A verwendet. Die Bindungskurve wurde durch Fitten mit Hill1 in Origin bestimmt.

Die 2'-F-Modifikation hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Bindung von RAID3 an den sIL-6R. Der ermittelte K_d nach Auswertung des FRA durch die Hill1-Gleichung lag bei $43,6 \pm 2,2$ nM. Dies entspricht der gleichen Größenordnung wie die K_d -Werte des unverkürzten F4 bzw. des unmodifizierten RAID3, die in Tabelle 20 dargestellt sind.

Ergebnisse

Tabelle 20: Affinität von F4, RAID3 und RAID3 2'-F für den sIL-6R.

Bezeichnung	Länge [nt]	K_d [nM]
F4	106	$34,8 \pm 5$
RAID3	34	$54,7 \pm 6$
RAID3 2'-F-Py	34	$43,6 \pm 2$

RAID3 U9C/G10A 2'-F zeigte erwartungsgemäß keine Bindung an den sIL-6R, was auf eine spezifische Bindung von RAID3 2'-F-Py an den sIL-6R schließen lässt. Die Struktur von RAID3 scheint im Gegensatz zu AIR-3A durch den Einsatz der 2'-F-Py-modifizierten Nukleotide nicht negativ beeinflusst zu werden.

5.5.2 Stabilität von RAID3 und RAID3 2'-F in DMEM

Der wichtigste Grund für den Einsatz 2'-modifizierter Nukleotide in RNA-Aptameren ist die daraus resultierende Steigerung der Resistenz gegenüber Serumnukleasen. Obwohl die potentielle *in vivo*-Anwendung häufig die ausschlaggebende Motivation für das Selektieren stabiler Aptamere ist, können diese auch in Zellversuchen Vorteile gegenüber nichtmodifizierten Aptameren bringen. Alle mit RAID3 durchgeführten Versuche wurden mit PBS/BSA als Puffersystem verwirklicht. Experimente, die eine längere Inkubation des Aptamers mit den Zellen erfordern, lassen sich mit unmodifizierter RNA jedoch nur in eingeschränktem Ausmaß durchführen, da sie eine Inkubation in serumhaltigem Medium voraussetzen.

Nachdem die Bindung der 2'-F-modifizierten Form RAID3 an den sIL-6R bereits nachgewiesen werden konnte, sollte die Stabilität des Aptamers in DMEM/10% FKS, dem Zellkulturmedium der BaF3-Zellen, überprüft werden. Dies erfolgte durch Inkubation der radioaktiv markierten RNA in DMEM/10% FKS bei 37°C. Nach festen Zeitintervallen wurden Aliquots der RNA abgenommen, in 2x RNA LD aufgenommen und zügig in flüssigem N₂ schockgefroren. Die RNA wurde dann über denaturierende PAGE getrennt und der Anteil nicht degradiertes RNA gegenüber der Gesamt-RNA autoradiographisch bestimmt. Die Auswertung der Stabilitätstests ist in Abbildung 39 dargestellt.

Ergebnisse

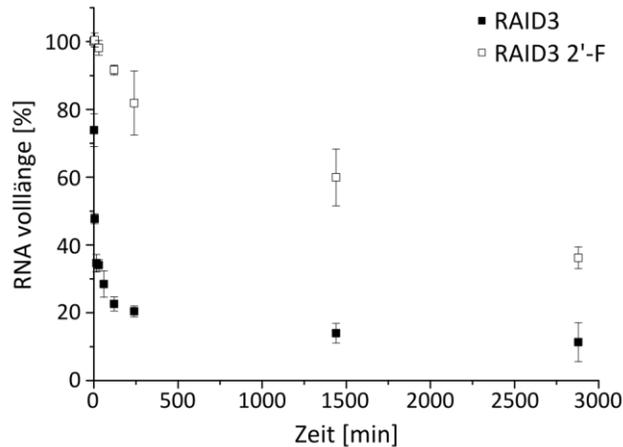


Abbildung 39: Stabilitätstest von RAID3 und RAID3 2'-F in DMEM/10% FKS. Für die Versuche wurde ^{32}P -markiertes RAID3 bzw. RAID3 2'-F über zwei Tage hinweg bei 37 °C in DMEM/10% FKS inkubiert. Proben der RNA in Medium wurden nach festen Zeitpunkten abgenommen, zügig in RNA-Ladepufferüberführt und in flüssigem N_2 schockgefroren. Die Proben wurden anschließend über denaturierende PAGE getrennt und autoradiographisch detektiert. Der Anteil an nicht degradiert RNA wurde anschließend grafisch dargestellt.

Während RAID3 und RAID3 2'-F in Bindungstests mit sIL-6R keine signifikanten Unterschiede zueinander aufwiesen, konnten deutliche Differenzen in der Stabilität der Aptamere unter Zellkulturbedingungen beobachtet werden. RAID3 wies eine, für eine nicht-modifizierte RNA, relativ lange Halbwertszeit von ca. 1-5 Minuten auf. Demgegenüber war RAID3 2'-F erst nach über 24h zu 50% degradiert und somit deutlich stabiler. Die Modifikation des Aptamers mit 2'-F Pyrimidinen führte folglich zu einer signifikanten Steigerung der Aptamer-Stabilität, ohne die Fähigkeit des Aptamers einzuschränken den sIL-6R zu binden.

6 Diskussion

Nukleinsäuren können sequenz- und kontextabhängig komplexe, dreidimensionale Faltungen annehmen und dadurch spezifisch mit anderen Molekülen interagieren. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für die ersten *in vitro*-Selektionsexperimente. In diesen wurde erfolgreich der Sequenzraum randomisierter RNA-Moleküle nach RNA-Spezies mit einer spezifischen Funktion durchsucht^{102,176}. Das diesen Experimenten zugrundeliegende Verfahren wurde mit dem Akronym SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) belegt und wird heute in einer Vielzahl von Variationen zur Gewinnung hochspezifischer und –affiner, DNA- oder RNA-Moleküle eingesetzt.

SELEX beruht auf iterativen Selektions- und Amplifikationszyklen, bei denen eine randomisierte Nukleinsäure-Bibliothek mit einer Variabilität von bis zu 10^{15} verschiedenen Sequenzen zusammen mit dem Zielmolekül inkubiert wird. Es folgt die Separation von Zielmolekül-gebundenen und freien Nukleinsäuren und die anschließende Amplifikation der gebundenen Fraktion. Dieser Prozess wird in der Regel 5-15 Mal wiederholt und die bindenden Nukleinsäuren anschließend charakterisiert.

Diese als Aptamere bezeichneten Liganden wurden erfolgreich für so diverse Ziele wie kleine Farbstoffmoleküle¹⁷⁷, Proteine¹¹², Viren¹⁷⁸ und ganze Zellen¹¹⁴ selektiert.

6.1 Selektion und Charakterisierung von IL-6R D3 spezifischen RNA-Aptameren

Ziel dieser Arbeit war die Selektion von RNA-Aptameren für die IL-6R D3. Nach drei Selektionszyklen mit sIL-6R und acht mit IL-6R D3 wurde die Bindung der angereicherten RNA-Bibliothek an sIL-6R und IL-6R D3 überprüft (Abbildung 15). Die Nukleinsäure-Bibliothek wurde nach dem Nachweis der Bindung kloniert und die erhaltenen Klone sequenziert.

Die Analyse der erhaltenen Klone durch *Alignment* nach Jotun-Hein in MegAlign (4.5.7) zeigte eine deutliche Anreicherung von Molekülen mit homologen Sequenzen. Diese wurden in fünf Familien eingeteilt, die unter sich hochkonservierte, im Falle der F2, F3 und F5 sogar identische, Sequenzen aufwiesen (Abbildung 16).

Insgesamt konnten 28 der 35 sequenzierten Klone den Familien F1-5 zugeordnet werden. Die F1 und F2 waren mit 10 bzw. 9 Vertretern deutlich häufiger vertreten als F3-5 (4, 3 und 2 Vertreter).

Diskussion

Es wurde davon ausgegangen, dass die Vertreter der Sequenzfamilien jeweils aus einem eigenen gemeinsamen Vorfahren, also einem ssDNA-Molekül der durch Festphasensynthese erzeugten unselektierten Bibliothek, hervorgegangen waren. Die Wahrscheinlichkeit für das unabhängige Vorkommen zweier identischer Sequenzen innerhalb der R1 Nukleinsäure-Bibliothek liegt, ausgehend von einer Ausgangsdiversität von 10^{13} DNA-Molekülen, bei $<7,5 \times 10^{-24}$. Variationen in den Sequenzen von F1 und F4 sollten demnach auf Mutationen während der PCR oder der *in vitro*-Transkription zurückzuführen sein.

Keiner der identifizierten Aptamerkandidaten wies starke Homologien zu bereits charakterisierten IL-6R-spezifischen Aptameren auf. Es konnten jedoch Gemeinsamkeiten zwischen den IL-6R D3-spezifischen und vorhergehend selektierten Aptameren festgestellt werden.

So wiesen die im Verlauf dieser Arbeit selektierten Sequenzfamilien einen hohen G-Anteil innerhalb der randomisierten Kernregion auf (F1: 44,4%, F2: 40,7%, F3: 41,7%, F4: 41,7%, F5: 35,2%). Auch das bereits früher für den IL-6R selektierte RNA-Aptamer AIR-3 zeichnet sich durch einen erhöhten Guaninanteil (31,7%) aus. G-Reiche Struktur motive besitzen möglicherweise eine höhere Wahrscheinlichkeit, Aptamere mit Binderegionen für den IL-6R hervorzubringen. Diese Hypothese wird durch die Verkürzung von F4 gestützt; RAID3 weist einen überdurchschnittlich hohen G-Anteil von 52,9% auf. Gleiches gilt für AIR-3, dessen verkürzte Form AIR-3A 68,4% Guanin beinhaltet. Ein Großteil der Guanine ist in den putativ strukturgebenden G-Quadruplexen von RAID3 und AIR-3A lokalisiert. Die Präferenz der für den IL-6R selektierten Aptamere, G-Quadruplexe auszubilden, könnte jedoch auch auf die verwendete Nukleinsäure-Bibliothek zurückgehen. Die R1-Nukleinsäure-Bibliothek kam sowohl in der Selektion für die IL-6R D3 als auch in der für den gesamten sIL-6R, aus der AIR-3 hervorgegangen war, zum Einsatz. Die unselektierte Nukleinsäure-Bibliothek könnte bereits einen erhöhten G-Anteil aufgewiesen und so die Selektion G-reicher Struktur motive begünstigt haben. Dies würde auch den hohen G-Anteil in den schwachaffinen Sequenzfamilien F1 und F5 erklären. Denkbar erscheint auch eine Kombination beider Faktoren als Erklärung für die Häufigkeit von Guaninen in den IL-6R spezifischen Aptameren.

Auswertungen von SELEX-Experimenten haben gezeigt, dass die Häufigkeit einer Sequenz nicht mit der vermittelten Affinität für das Zielprotein korrelieren muss¹⁵⁸. Diese Beobachtung konnte

Diskussion

für die IL-6R D3 spezifischen Aptamere bestätigt werden. Obwohl F4 weniger als 10% der analysierten Stichprobe der angereicherten R1 RNA-Bibliothek entsprach, wies das Aptamer mit $34,8 \pm 5$ nM den niedrigsten K_d für die sIL-6R D3 selektierten Aptamere auf (Tabelle 17).

Die Anreicherung von Aptameren im Verlauf einer SELEX wird durch das Zusammenwirken vieler Faktoren bestimmt. Die Stringenz der Waschschrte wird schrittweise erhöht, um den Selektionsdruck möglichst stark zugunsten hochaffiner Aptamere zu verschieben. Aptamere mit einer schnelleren Assoziation können bei einem immobilisierten Zielmolekül jedoch gegenüber langsamer assoziierenden Aptameren einen Selektionsvorteil besitzen. Die Immobilisierung des Proteins erzeugt eine hohe lokale Dichte auf der Oberfläche der magnetischen Partikel. Dies erlaubt es schnell assoziierenden und dissoziierenden Aptameren aufgrund der räumlichen Nähe schnell an ein benachbartes Zielmolekül zu binden. Dieses wird dann für Aptamere mit langsamerer Dissoziation, aber insgesamt besserer Affinität für das Zielmolekül, blockiert. Die hohe Dichte des Zielproteins auf der Partikeloberfläche kann auch die Selektion von Aptameren begünstigen, die kooperativ an das Zielmolekül binden¹¹⁶. Ozer *et al.* konnten zeigen, dass in einer SELEX mit hoher Zielmoleküldichte Aptamere auftraten, die bis zu vier immobilisierte Streptavidine gleichzeitig binden konnten. Dies führte zu einer Erhöhung der effektiven Affinität eigentlich schwach affiner Aptamere für das immobilisierte Zielmolekül um bis zu zwei Größenordnungen¹⁷⁹.

Nicht zuletzt wirken sich auch die Amplifikationsschritte auf die Verschiebung der relativen Häufigkeit der Aptamere aus. So könnten Sekundärstrukturen die Zugänglichkeit der konstanten 3'-Region der Aptamere beschränken. Dies könnte die Bindung des Revers-Primers und daraus resultierend die Gegenstrangsynthese in der reversen Transkription stören. Auch kann die Faltung des Aptamers die Gegenstrangsynthese durch die reverse Transkriptase behindern. Vor der reversen Transkription wurden die eluierten Aptamere zunächst auf 65 °C erwärmt und anschließend schlagartig abgekühlt. Die RT-Reaktion selbst fand bei 54 °C statt. Möglichst hohe Temperaturen während der Reaktionen sollten gewährleisten, dass Strukturelemente der RNA destabilisiert und die Nukleinsäuren so zugänglich für Primer und reverse Transkriptase waren. Während der Selektion der IL-6R D3-spezifischen RNA-Aptamere konnten PCR-Artefakte nachgewiesen werden, die in der analytischen PAGE eine apparente Größe von ca. 65 bp aufwiesen (5.1.2). Die Sequenzierung dieser DNA-Moleküle zeigte, dass es sich um Fusionen der

Diskussion

konstanten 5'- und 3'-Region der R1-Nukleinsäure-Bibliothek handelte. Das Auftreten dieser PCR-Artefakte könnte auf Stamm-Schleife-Strukturen der randomisierten Region der Templat-RNA oder -DNA zurückgehen, die von der Polymerase während der Amplifikation übersprungen wurden und so als Matrize für verkürzte PCR-Produkte mit teilweise oder vollständig deletierter Kernregion dienen. Die Konzentration der verkürzten PCR-Produkte war nach Abschluss der PCR deutlich höher als die des eigentlichen PCR-Produktes (Abbildung 14). Auch konnte ihr Auftreten häufig vor dem des eigentlichen PCR-Produktes beobachtet werden. Das Entstehen dieser Artefakte verdeutlicht den Stellenwert der Amplifikationsschritte als weiteren Selektionsfaktor im Verlauf der Aptamer-Anreicherung. F4, oder ein möglicherweise noch affineres Aptamer, könnte die Nukleinsäure-Bibliothek nach dem Elutionsschritt der SELEX zunächst dominiert haben, jedoch während der RT-PCR bzw. der *in vitro*-Transkription durch andere Nukleinsäuremoleküle mit höheren Amplifikations- oder Transkriptionsraten verdrängt worden sein. Ein Aptamer mit geringerer Affinität, aber höheren Amplifikationsraten, kann deshalb eine höhere Abundanz in der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek erreichen als ein hoch affines Aptamer mit geringer Amplifikations- oder Transkriptionseffizienz. Aufschluss über die Dynamik der Häufigkeiten einzelner Aptamere im Verlauf einer SELEX lässt sich durch *Next Generation Sequencing* (NGS) erlangen. Die Methode erlaubt die parallele Sequenzierung der angereicherten Nukleinsäure-Bibliothek mehrerer Selektionszyklen bei nahezu vollständiger Abdeckung der Nukleinsäurediversität. In der systematischen Analyse einer Model-SELEX für Streptavidin durch (NGS) konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Aptamere im Verlauf der Selektion glockenkurvenartige, relative Anreicherungs- und Abreicherungsraten aufwiesen. Das Aptamer mit der höchsten Affinität für Streptavidin erreichte dabei seine maximale, relative Häufigkeit nach SELEX-Zyklus 7 und wurde in den folgenden SELEX-Zyklen zugunsten schlechterer Binder abgereichert¹⁵⁸. Die Autoren schlussfolgern, dass die Selektionsbedingungen Nukleinsäuren mit höheren PCR-Anreicherungsraten gegenüber Aptameren mit besserer Affinität für das Zielmolekül begünstigten. Eine mögliche Lösungsstrategie für diese Problematik ist Teil eines fortlaufenden Projektes, auf das in 7.1 eingegangen wird.

Es ist im Nachhinein schwer bestimmbar, welche Faktoren zur stärkeren Anreicherung von F1 und F2 geführt haben. F2 weist mit $92,7 \pm 18$ nM einen relativ niedrigen K_d für den sIL-6R auf, F1 bindet jedoch, wenn überhaupt, nur schwach an das Zielprotein (Abbildung 18A). Die maximale Bindung

Diskussion

der Bibliothek nahm im Verlauf der Selektion, zumindest im Vergleich zwischen SELEX-Zyklus 5 und 10 (Abbildung 15), zu. Zudem wurde davon ausgegangen, dass die Nukleinsäure-Bibliothek bei dem Wechsel zu Domäne 3 zunächst von Aptameren für die Bindestelle von AIR-3A auf der Oberfläche des sIL-6R dominiert wurde. Obwohl eine möglichst geringe Zahl von SELEX-Zyklen mit dem Mindestmaß an Amplifikationsschritten bei SELEX-Experimenten anzustreben ist, befindet sich Selektionszyklus 11 deshalb vermutlich innerhalb der optimalen Anreicherungsrate für IL-6R D3-bindende Aptamere in der Nukleinsäure-Bibliothek.

Es könnte sich trotzdem als lohnend erweisen, die SELEX für die IL-6R D3 nochmals durch NGS zu untersuchen. Besonders die Zusammensetzung der R1-RNA-Bibliothek während der Selektionszyklen 3, 4 und 5, dem Übergang von sIL-6R zur Domäne 3 des Rezeptors als Zielmolekül, würde sich für eine solche Untersuchung anbieten.

Anhand der Sequenzierungsdaten ließe sich die Anreicherung der Domäne-3-spezifischen Aptamere nachvollziehen und ein nahezu vollständiges Abbild der Zusammensetzung der Bibliothek erstellen.

6.2 Aptamer-vermittelte Blockierung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion

Obwohl die Kristallstruktur des IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes vermutlich nicht dem eigentlichen, aktiven Rezeptorkomplex entspricht (Abbildung 2), vermag sie doch einen Eindruck der für Aptamerbindung zugänglichen Positionen des IL-6R, im speziellen der Domäne 3 zu vermitteln. Die IL-6R D3 steuert mehr als 70% der Interaktionsoberfläche des IL-6R mit IL-6 bei¹³, große Bereiche dieser Rezeptordomäne sind jedoch nicht direkt an der Zytokin- oder Co-Rezeptorbindung beteiligt (Abbildung 40).

Diskussion

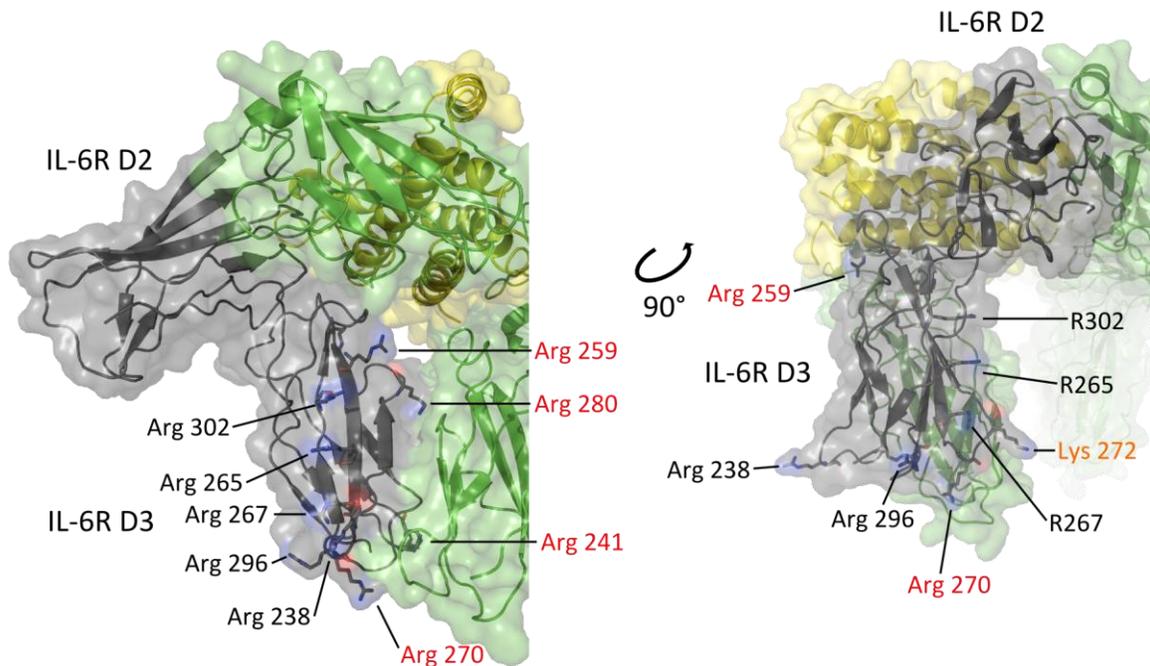


Abbildung 40: Interaktion des sIL-6R mit sgp130 und IL-6. Abgebildet sind IL-6, die drei N-terminalen Domänen D1 (Ig-ähnlich) und D2-D3 (FNIII-ähnlich) des gp130 sowie die Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 des IL-6R. Die Arginine und Lysine der IL-6R D3 wurden hervorgehoben und teilweise gekennzeichnet. Aminosäuren, die potentiell für die Interaktion mit RAID3 zur Verfügung stehen könnten, wurden schwarz markiert, an der Bindung von IL-6 oder gp130 beteiligte oder durch diese maskierte rot beschriftet. Lys272, dessen Zugänglichkeit für die Aptamer-Interaktion zweifelhaft ist, wurde orange beschriftet. PDB-id: 1P9M¹³.

Das IL-6R D3-bindende Aptamer F4 und dessen minimierte Form RAID3 binden den sIL-6R sowohl frei in Lösung als auch im Kontext des Rezeptorkomplexes IL-6/sIL-6R bzw. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc (Abbildung 20). Dies legt nahe, dass RAID3 nicht direkt mit IL-6 oder gp130 um die Bindung am IL-6R konkurriert, im Umkehrschluss also nicht zur Blockierung des Rezeptors geeignet ist. Es liegen zu diesem Zeitpunkt keine exakten Informationen über die Bindungsstelle von RAID3 am IL-6R vor. Da jedoch im IL-6/sIL-6R/sgp130Fc-Komplex größere Teilbereiche des sIL-6R maskiert sind, liegt eine Bindung an der Innenseite der durch Domäne 2 und 3 gebildeten „Armbeuge“ nahe (Abbildung 40). Die potentiell für die Bindung durch RAID3 zugänglichen Bereiche lassen sich durch Betrachtung des elektrostatischen Potentials der IL-6R-Oberfläche weiter eingrenzen.

Diskussion

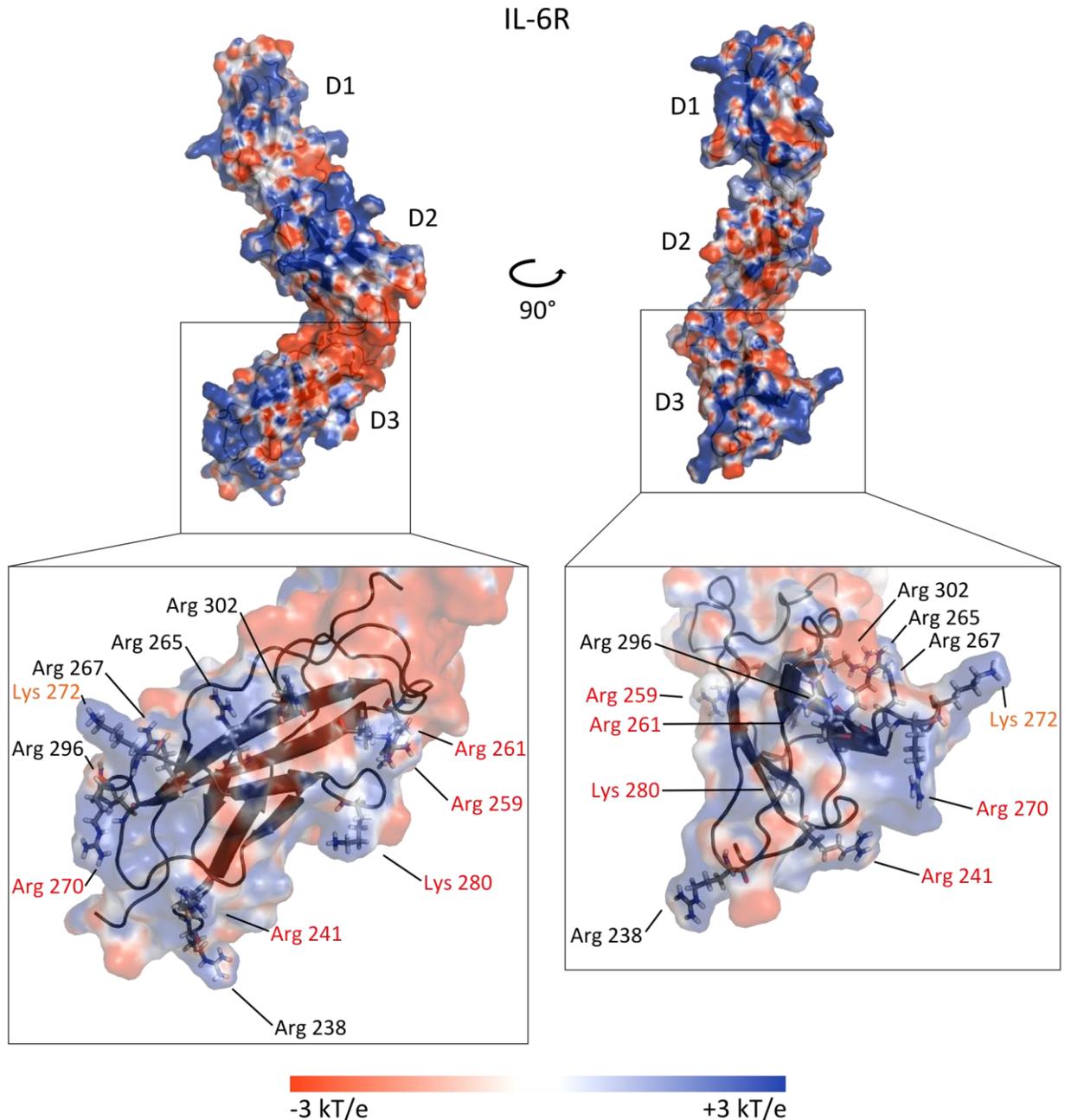


Abbildung 41: Elektrostatistisches Potential der sIL-6R-Oberfläche. Durch das *PyMOL* Plugin APBS wurde das elektrostatistische Potential der sIL-6R-Oberfläche berechnet. Die Arginine und Lysine der IL-6R D3 wurden hervorgehoben und teilweise gekennzeichnet. Solche, die potentiell für die Interaktion mit RAID3 zur Verfügung stehen, wurden schwarz, an der Bindung von IL-6 oder gp130 beteiligte oder durch diese maskierte, rot markiert. Lys272 wurde orange beschriftet.

Ihre negative Ladung bedingt eine Präferenz von Aptameren für positiv geladene Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen. Die statistische Auswertung von RNA-Proteinkomplex-Datensätzen

Diskussion

erlaubt Rückschlüsse auf generelle Trends, die die Interaktion von Ribonukleinsäuren mit den Aminosäuren eines Proteins charakterisieren^{163,180-182}.

- 1) Arginin und Lysin stellen die favorisierten Reste bei der Bindung von RNA dar.
- 2) Kontakte des Phosphatrückgrats werden gegenüber solchen der Base bevorzugt.
- 3) Es sind vor allem die Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins, die mit der RNA interagieren.

Die Interaktion von RNA mit Proteinen wird durch Van der Waals-Kräfte dominiert. Neben der Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Keesom-Wechselwirkung) der Seitenkette des Arginins mit dem Phosphatrückgrat können deshalb auch unpolare Aminosäurereste mit der Ribose oder Base der Nukleinsäure interagieren und zur Ausbildung der RNA-Protein-Bindung beitragen¹⁸⁰. Arginin und Lysin überwiegen auch bei der Interaktion durch Wasserstoffbrückenbindungen, die nach den Van der Waals-Kräften die zweite wichtige Klasse von molekularen Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen darstellen.

Die IL-6R D3 weist auf dem potentiell für RAID3 zugänglichen Oberflächenbereich fünf Arginine auf (Arg238, Arg265, Arg267, Arg296 und Arg302; Abbildung 41). Diese sind weder an der Bindung an gp130 und IL-6 beteiligt, noch werden sie durch diese maskiert (Abbildung 40). Arg265, Arg267 und Arg302 bilden zusammen einen Streifen mit positivem elektrostatischen Potential an der Flanke der IL-6R-Oberfläche. Die Guanidinium-Gruppe des Arginins 296 ist an der Ausbildung einer Fläche mit hohem positiven elektrostatischen Potential auf der Rückseite der IL-6R D3 beteiligt. Arg238 schließlich befindet sich zwar in räumlicher Nähe des mit dem IL-6R assoziierten gp130, wird durch dieses jedoch nur lateral blockiert und weist ebenfalls potentiell für die RAID3-Interaktion zur Verfügung stehende Wasserstoffbrücken-Donoren auf (Abbildung 40 und Abbildung 41). Eine mögliche Beteiligung von Lys272 an der RAID3-Bindung zum sIL-6R kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich. Zum einen lag dieser Rest im Verlauf der SELEX vermutlich größtenteils biotinyliert vor (4.1.5), zum anderen grenzt er direkt an die Domäne 3 des gp130 im IL-6-Rezeptorkomplex.

6.3 Verkürzung und strukturelle Untersuchung von F4

Trotz signifikanter Fortschritte in der Festphasensynthese von polymeren Nukleinsäuren ist die chemische Herstellung langer RNA mit hohem Aufwand und Kosten behaftet. Es ist deshalb

Diskussion

erstrebenswert, RNA auf die für die Aktivität relevanten Abschnitte zu verkürzen. Die Verkürzung eines Aptamers auf sein minimales Bindemotiv senkt nicht nur die Kosten für dessen kommerzielle Synthese, sondern erleichtert auch die weitere Charakterisierung. Dies gilt im Besonderen für die strukturelle Untersuchung der Nukleinsäure. Nicht an der Bindung beteiligte Nukleotide können nichtsdestotrotz Sekundär- oder Tertiärstrukturen ausbilden, die die Identifikation des eigentlichen Bindemotives und dessen Faltung erschweren.

Das sukzessive Kürzen von F4 anhand der Sekundärstrukturvorhersagen resultierte in der 34 nt Variante RAID3 (Abbildung 42).

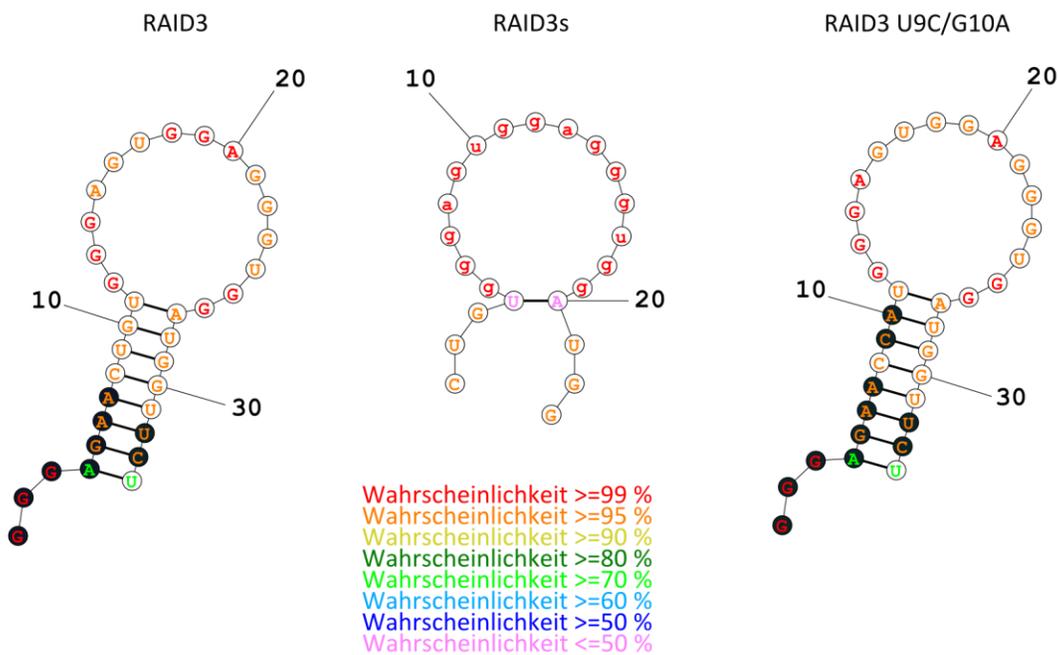


Abbildung 42: Sekundärstrukturvorhersage von RAID3, RAID3s und RAID3 U9C/G10A. Die vollständige Sequenz von RAID3 und RAID3s wurde in das Browser-basierte Programm *RNAstructure* eingegeben. Die Sekundärstrukturvorhersage fand unter Verwendung der Standardeinstellungen des Programms statt. Für RAID3s wurden die Basen der putativen Schleife als ungepaart festgelegt. Es wurde die Sekundärstrukturvorhersage mit der geringsten Gibbs-Energie übernommen. Basen, die gegenüber F4 ausgetauscht wurden, sind schwarz hinterlegt.

Die Substitutionen des terminalen Bereiches des putativen Stammes zur Optimierung der Ausbeute der *in vitro*-Transkription hatte keinen Einfluss auf die Affinität der F4-Variante RAID3 (Tabelle 18). Daraus wurde geschlossen, dass die Sequenz der terminalen Nukleotide des putativen Stammes von RAID3 keinen direkten Einfluss auf die Bindung an den sIL-6R ausübt, diese Region vermutlich also nicht direkt an der Aptamer-Protein-Interaktion beteiligt ist. Der

Diskussion

Verlust der Affinität des weiter verkürzten RAID3s zeigt jedoch, dass das Vorhandensein komplementärer Basen im terminalen Stamm wichtig für die Bindung von RAID3 an den sIL-6R ist. Obwohl sich dieses Ergebnis mit der prognostizierten Stamm-Schleifen-Struktur von RAID3 deckt, ist die tatsächliche Faltung des Aptamers vermutlich komplexer und weicht von der Sekundärstrukturvorhersage ab.

So offenbarte die Untersuchung von RAID3 U9C/G10A Diskrepanzen zwischen dem erwarteten und beobachteten Bindungsverhalten dieser Variante mit stabilisiertem Stamm. Der Austausch der *Wobble*-Basenpaare zwischen U9 und G29 sowie G10 und U28 im Schleife-nahen Stammbereich gegen kanonische Watson-Crick-Basenpaare führte zu einem vollständigen Verlust der Affinität der RNA für ihr Zielmolekül (Abbildung 38 und Abbildung 42). Dies lässt sich nur schwer mit der Prognose des proximal zur Schleife gelegenen Stamms von RAID3 in Einklang bringen und deutet auf eine alternative Konformation des Aptamers in dieser Region hin.

Die Untersuchung der RAID3-Sequenz durch *GQRS-Mapper*¹⁸³ zeigte, dass das Aptamer potentiell einen Q-Quadruplex ausbilden könnte und dieser, zumindest in Teilen, mit der putativen Schleife der Sekundärstrukturvorhersagen korrespondiert. Der höchste *G-Score* (20) wurde dabei für einen Quadruplex von G18 bis G30 prognostiziert.

Während DNA-Quadruplexe polymorphe Topologien aufweisen, zeigen viele, wenn nicht alle, RNA-G-Quadruplexe eine parallele Strangorientierung. Parallele G-Quadruplexe zeichnen sich durch ein charakteristisches CD-Spektrum mit einem Maximum bei 265 nm und einem Minimum bei 240 nm aus^{166,184,185}. Hinweise auf die Ursache dieser topologischen Homogenität gibt die Kristallstruktur telomerer RNA-G-Quadruplexe. Diese weisen in den die Tetraden verbindenden Propeller-Schleifen mehrere 2,7 Å-Wasserstoffbrücken auf, die durch die 2'-OH-Gruppe der Ribose gebildet werden. Diese Wasserstoffbrücken könnten einen substantiellen Beitrag zur Stabilität der Schleife und somit des G-Quadruplexes an sich leisten¹⁸⁵. RNA weist zudem die Tendenz auf, die Anti-Konformation in der glykosidischen Bindung der Base zur Ribose anzunehmen. Da nur in parallelen G-Quadruplexen alle Guanine der Tetraden in der Anti-Konformation vorliegen, könnten diese von RNA-G-Quadruplexen bevorzugt werden¹⁸⁶

Tatsächlich zeigte RAID3 in der spektroskopischen Untersuchung durch UV-CD den erwarteten Kurvenverlauf. Es konnte Kalium-abhängig ein Maximum bei 265 nm und ein Minimum bei 240 nm nachgewiesen werden. Dies deutet auf die Formation eines parallelen G-Quadruplexes

Diskussion

durch das Aptamer hin (Abbildung 30). In Bezug auf die Sekundärstrukturvorhersage stützen die CD-spektroskopischen Messungen die Hypothese einer von der Prognose abweichenden Konformation des Stammes von RAID3. Da kein ausgeprägtes Signal für Duplex-RNA im CD-Spektrum des Aptamers beobachtet werden konnte, erscheint die vollständige Ausbildung des Stammes unwahrscheinlich. Ein G-Quadruplex, der die Nukleotide 18-30 von RAID3 einschließt, würde dagegen mit dem beobachteten CD-Spektrum des Aptamers ein Einklang stehen. Dies würde jedoch die Verfügbarkeit der beiden Guanine G29 und G30 für die Ausbildung des Quadruplexes voraussetzen.

Genau diese scheint im Falle der RAID3-Variante U9C/G10A nicht gegeben. CD-Messungen mit RAID3 U9C/G10A zeigten das charakteristische Spektrum eines A-Form RNA-Duplexes¹⁶⁹ (Abbildung 30) und unterschieden sich deutlich von den für RAID3 erzielten Spektren. Die Ausbildung eines G-Quadruplexes durch RAID3 U9C/G10A erscheint dagegen unwahrscheinlich, da keine Kalium-abhängige Änderung im Circular-Dichroismus der Variante beobachtet werden konnte.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass RAID3 U9C/G10A, im Gegensatz zu RAID3, die durch die Sekundärstrukturvorhersage prognostizierte Stammschleifen-Konformation annimmt, gerade deshalb jedoch nicht mehr in der Lage ist, den sIL-6R zu binden. Unklar ist, ob sich im terminalen Bereich von RAID3 dennoch ein kurzer Stamm ausbildet. Die fehlende Affinität von RAID3s (Abbildung 42) für den sIL-6R deutet darauf hin, dass der terminale Bereich von RAID3 für die Bindung an den sIL-6R notwendig ist. Da jedoch sechs der acht äußeren, stammbildenden Nukleotide in RAID3 gegenüber F4 ohne Konsequenz für die Affinität des Aptamers für den sIL-6R ausgetauscht werden konnten, scheint keine direkte Sequenzabhängigkeit dieser Nukleotide für die Ausbildung des aktiven Aptamers zu bestehen (Abbildung 24 und Abbildung 42). Ein schwaches Minimum bei 210 nm im CD-Spektrum von RAID3 könnte zwar auf das Vorhandensein einiger gepaarter Basen im Aptamer hindeuten, ist aber zu wenig markant, um zuversichtliche Aussagen über das Vorhandensein einer kurzen Stammregion im Aptamer zu erlauben (Abbildung 30).

Das in Abbildung 43 dargestellte Modell und dessen Fit in die durch SAXS gewonnenen Strukturdaten (Kapitel 5.3.5) stellen die momentane Arbeitshypothese zur dreidimensionalen Faltung von RAID3 dar.

Diskussion

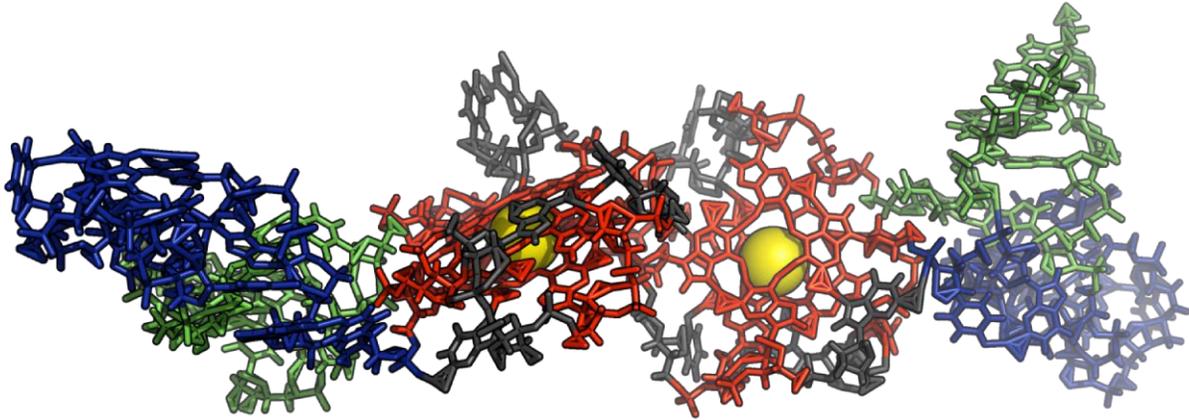


Abbildung 43: Strukturmodell der dreidimensionalen Faltung von RAID3. Anhand des dreidimensionalen Modells von RAID3¹⁷⁰ wurden die putativen Strukturelemente des Aptamers farblich hervorgehoben. Die Tetraden-formenden Guanine (rot) bilden zusammen mit kurzen Propeller-Schleifen (schwarz) und einem zentralen Kalium-Ion (gelb) den strukturbestimmenden G-Quadruplex. Gemeinsam mit einer kurzen, terminalen Stamm-Region (grün) flankiert der G-Quadruplex einen flexiblen Molekülabschnitt (blau). Die Untersuchung der RAID3-Struktur durch SAXS deutet zudem auf ein durch das Aptamer gebildetes Homo-Dimer hin.

Demnach bilden die Nukleotide 18-30 einen G-Quadruplex aus, der zusammen mit einem kurzen terminalen Stamm einen flexiblen Molekülabschnitt zwischen C8 und U17 flankiert. Dieser könnte die Interaktion des Aptamers mit der IL-6R D3 vermitteln und durch die Bindung an das Zielprotein stabilisiert werden. Die putative Stabilisierung der flexiblen Region könnte zudem zur Stabilisierung des Stamms der terminalen Region beitragen. Sollte die Stammregion erst durch Bindung des Aptamers an den IL-6R ausgebildet werden, könnte dies auch das Fehlen eindeutiger Signale für Duplex-RNA im CD-Spektrum von RAID3 erklären. RAID3 konnte in den SAXS-Messungen nur als Homo-Dimer detektiert werden. Dies könnte eine Folge der Selektion mit immobilisierter IL-6R D3 darstellen. Bei hoher Dichte des Zielproteins auf den magnetischen Partikeln könnte ein Aptamer-Dimer möglicherweise zwei Moleküle IL-6R D3 kooperativ gebunden und so einen Selektionsvorteil gegenüber Aptameren mit nur einer Binderegion erhalten haben. In Abschnitt 7.2 wird näher auf Experimente eingegangen, die eine weitere strukturelle Charakterisierung von RAID3 erlauben würden.

6.4 Charakterisierung der Bindung von RAID3 an IL-6R-präsentierende BaF3-Zellen

Die aus dem murinen Knochenmark stammenden BaF3-Zellen sind eine Prä-B-Zelllinie, die in Kultur IL-3-abhängig wächst. Die Generationszeit dieser schnell proliferierenden Zelllinie beträgt 14 bis 18 h. In Abwesenheit von IL-3 sterben die Zellen nach ca. 24-36 h. Obwohl Prä-B-Zellen im natürlichen Umfeld zu B-Zellen differenzieren, konnte dies auch nach 35 Monaten kontinuierlicher Inkubation in der Zellkultur nicht beobachtet werden¹⁸⁷. Die Abhängigkeit der BaF3-Zellen von exogenem IL-3 kann jedoch durch Transfektion mit konstitutiv aktiven Tyrosinkinasen aufgehoben werden. Aufgrund dieser Eigenschaft haben sich BaF3-Zellen zu einem Modellsystem für die Untersuchung onkogener Kinasen und deren medizinischer Relevanz entwickelt¹⁸⁸.

BaF3-Zellen, die transgeneshumanes *IL-6R* und *gp130* exprimieren, erlauben die Substitution von mIL-3 durch hIL-6 und können in Kultur IL-6-abhängig proliferieren. BaF3-Zellen, die nur humanes *gp130* auf ihrer Oberfläche präsentieren, können über *trans-signaling* durch humanen sIL-6R und IL-6, oder alternativ Hyper-IL-6, stimuliert werden. Die Abhängigkeit von humanem IL-6 bzw. Hyper-IL-6 macht transgene BaF3-Zellen deshalb zu einem idealen Modellsystem für die Evaluation IL-6R-bindender Aptamere, da ein beständiger Selektionsdruck auf die konstitutive Präsentation des IL-6R ausgeübt wird.

Die Bindung von Atto 647N-markiertem RAID3 an IL-6R-präsentierende BaF3-Zellen konnte durch LSM und Durchflusszytometrie verifiziert werden. Es wurden jedoch deutliche Unterschiede in der Verteilung und Intensität der Fluoreszenz zwischen BaF3/*gp130*/IL-6R/TNF-Zellen, die mit RAID3-Atto 647N und solchen, die mit AIR-3A-Atto 647N inkubiert wurden, beobachtet (Abbildung 32). Obwohl beide Aptamere IL-6R-spezifisch an die BaF3-Zellen banden, konnte nur AIR-3A-Atto 647N auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 32). RAID3-Atto 647N war dagegen nur in Kompartimenten innerhalb der Zellen nachweisbar (Abbildung 32). Von AIR-3A-Atto 647N ist bekannt, dass das Aptamer IL-6R spezifisch von BaF3-Zellen internalisiert wird¹⁵⁰. Die Beobachtung, dass RAID3-Atto 647N ebenfalls in Kompartimenten innerhalb der Zelle vorzuliegen schien, war deshalb nicht vollkommen unerwartet.

Diskussion

Durch die Behandlung der Zellen mit DMEM/10% FKS sollten Aptamere auf der Oberfläche der Zellen hydrolysiert werden. Die verbleibenden Fluoreszenzsignale sollten dementsprechend von Aptameren stammen, die bereits durch die Zellen IL-6R-abhängig internalisiert worden waren. BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen, die mit AIR-3A-Atto 647N inkubiert worden waren, zeigten nach der Behandlung mit DMEM/10% FKS eine deutlich verringerte Fluoreszenz (Abbildung 33). Die Lokalisation und Intensität der verbliebenen Fluoreszenz glich phänotypisch der von BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen, die mit RAID3-Atto647N inkubiert worden waren. Für RAID3-Atto 647N konnten dagegen keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Inkubationsbedingungen festgestellt werden (Abbildung 33). Dies deutet darauf hin, dass RAID3-Atto 647N nach dem Waschen der Zellen exklusiv kompartimentiert innerhalb der Zellen vorliegt, nicht jedoch auf deren Oberfläche. Die Internalisierung von RAID3-Atto647N war überwiegend IL-6R spezifisch, zum Teil konnte das Aptamer jedoch auch in vereinzelt BaF3/gp130 Zellen beobachtet werden.

Der Grund für fehlende Fluoreszenz an der Oberfläche von Zellen, die mit RAID3-Atto 647N inkubiert worden waren, konnte nicht festgestellt werden. Die zur Bestimmung der Affinität des Aptamers verwendeten Methoden waren nicht zur Charakterisierung der Bindungskinetik von RAID3 zum sIL-6R geeignet. Eine schnelle Dissoziation des Aptamers von den Zellen nach dem Waschschrift könnte die Abwesenheit des Aptamers von der Zelloberfläche möglicherweise erklären. Die Analyse durch FRA schließt zwar zwei Waschschrift nach Bindung des Aptamer-Protein-Komplexes an die Nitrozellulosemembran mit ein, diese sind jedoch nicht analog zu dem Waschschrift der Zellen nach Inkubation mit dem Aptamer. Während der Messungen der Affinität des Aptamers mit dem sIL-6R durch MST befinden sich beide Moleküle im Gleichgewicht, weshalb eine Bestimmung der Kinetik durch diese Methode nicht möglich ist. Alle Waschschrift mit den BaF3-Zellen fanden bei 4 °C statt, auch wurden die Proben bis zur Messung auf Eis gelagert. Darüber hinaus fielen die Waschschrift für an die Zellen gebundene Aptamere milder aus, als es im FRA der Fall war. Die vollständige Dissoziation des Aptamers von den Zellen erschien deshalb ungewöhnlich.

Eine alternative Erklärung für die fehlende Lokalisation von RAID3 auf der Zelloberfläche wäre die sterische Hinderung der Aptamer-Bindung an Membran-gebundenen IL-6R. Dies könnte durch Interaktion des IL-6R mit anderen, an der Zelloberfläche befindlichen Proteinen geschehen. Zu

Diskussion

diesem Zeitpunkt lässt sich allerdings über diese Möglichkeit allerdings nur spekulieren. Es gibt jedoch Hinweise, dass der IL-6R als präformiertes Dimer auf der Zelloberfläche und in Lösung vorliegt¹⁸⁹. Sollte die Interaktion zweier IL-6R auf der Plasmamembran die Interaktion mit RAID3 stören, könnte dies die fehlende Fluoreszenz auf der Zelloberfläche erklären. Dieses Modell setzt allerdings voraus, dass sich das IL-6R-Dimer während der Internalisierung des Rezeptors auflöst und so die Bindung von RAID3 ermöglicht. Auch das Reaktionsgleichgewicht zwischen Monomer und Dimer müsste zwischen Membran-ständigem und löslichem IL-6R unterschiedlich ausfallen, um die Bindung von RAID3 an den sIL-6R zu erklären. Von gp130 ist bekannt, dass es auf einigen Zellen lokalisiert in Membranflößen und Caveolae vorkommt^{190–192}. Die räumliche Nähe der Rezeptormoleküle auf der Plasmamembran könnte das Reaktionsgleichgewicht hin zum dimerisierten Zustand verschieben und so die Bindung von RAID3 erheblich einschränken.

Sollte die Bindestelle des IL-6R für RAID3 nur während der Internalisierung des Rezeptors zugänglich sein, würde dies das Fehlen von Fluoreszenzsignalen an der Zelloberfläche erklären.

Die Charakterisierung der Temperaturabhängigkeit der Bindung von RAID3-Atto647N an BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen wurde durchflusszytometrisch durchgeführt. Da die Internalisierungsrate von Oberflächenproteinen durch Zellen bei niedrigen Temperaturen verringert ist, wurde eine reduzierte Fluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit RAID3-Atto 647N erwartet. Der Vergleich der Fluoreszenzintensität von BaF3/gp130/IL-6R/TNF-Zellen, die bei 37 °C und bei RT mit RAID3-Atto 647N inkubiert worden waren, bestätigte diese Annahme (Abbildung 36).

Die Durchführung weiterführender Zellversuche würde durch die Verwendung eines serumstabilen RNA-Aptamers erleichtert werden. Da F4 unter Verwendung natürlicher Nukleotide selektiert worden war, wurde deshalb das Potential, F4 und RAID3 postselektiv zu stabilisieren, im nächsten Schritt überprüft.

6.5 Postselektive Modifikation von RAID3

Das Rational modifizierte Nukleotide für Aptamere zu verwenden, begründet sich in der Anfälligkeit natürlicher Nukleinsäuren, im Speziellen RNA, gegenüber ubiquitär präsenten Nukleasen in biologischen Flüssigkeiten. RNA weist in Serum üblicherweise eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden auf^{f131,193}. Die 2'-OH-Gruppe der RNA befindet sich in räumlicher Nähe

Diskussion

zu dem elektrophilen Phosphoratom der Phosphordiesterbindung zwischen je zwei benachbarte Ribosen. Die Umesterung der Phosphatgruppe durch RNasen oder im Basischen resultiert in einem zyklischen 2'-3'-Phosphodiester am selben Zucker und folglich zu einer Spaltung der RNA. Der Austausch von natürlichen Nukleotiden durch 2'-modifizierte Analoga kann die Stabilität von RNA deshalb signifikant erhöhen. Die Verwendung von 2'-Desoxy-2'-fluoropyrimidine hat sich in der Praxis als Methode zur Stabilisierung von Aptameren sowohl während der Selektion als auch postselektiv etabliert^{110,126,131,193}. Der Einsatz modifizierter Nukleotide erfolgt jedoch üblicherweise während der SELEX, da die postselektive Modifikation von Aptameren deren Faltung beeinflussen und daraus folgend deren Affinität kompromittieren kann^{129,193}.

2'-F-Py liegt nahezu ausschließlich in der C3'-Endo-Konformation vor und zeigt damit die gleiche strukturelle Präferenz der Zuckerkonformation wie natürliche Ribonukleotide^{194,195}. Die strukturellen Konsequenzen für den Einbau von 2'-F-Py in ein RNA-Aptamer sind folglich weniger ausgeprägt als die von beispielsweise 2'-NH₂-Pyrimidinen, die die C2'-Endo-Konformation bevorzugen¹⁹³. Dennoch hat der Austausch der 2'-Gruppe durch Fluor häufig strukturelle Folgen. Die thermische Stabilität von 2'-F-modifizierter Duplex-RNA ist gegenüber der natürlicher RNA deutlich erhöht. Dies ist auf stärkere *Stacking*-Interaktionen und auch eine Erhöhung der Enthalpie der Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen¹⁹⁶. Zudem kann die 2'-OH-Gruppe durch Wasserstoffbrücken chemisch mit anderen Molekülen interagieren und bewirkt eine höhere Hydratisierung der RNA. 2'-F-modifizierte RNA zeichnet sich deshalb gegenüber sequenzidentischer, natürlicher RNA durch eine veränderte Hydrathülle aus¹⁹⁶. Zusammengenommen vermögen diese Faktoren die Faltung und Flexibilität des Aptamers sowie die Interaktion mit dem Zielmolekül zu beeinflussen.

Für RAID3 2'-F-Py konnten jedoch keine negativen Effekte für die Affinität zum sIL-6R beobachtet werden. Die während der Untersuchung des modifizierten Aptamers erzielten Ergebnisse sind in Hinblick auf die Literatur jedoch höchst unerwartet. Publizierten Arbeiten zur postselektiv Modifikation von Aptameren mit 2'-F-Py zeigten eine Zunahme des K_d um den Faktor 4,5-10, weshalb generell von einer postselektiven Modifikation der Pyrimidine abgesehen wird.^{193,197}. Das ebenfalls für den IL-6R selektierte, verkürzte RNA-Aptamer AIR-3A verliert 2'-F-Py modifiziert sogar gänzlich die Fähigkeit, den sIL-6R zu binden¹²⁹. Das unverkürzte Aptamer AIR-3 zeigte 2'-F-Py-modifiziert zwar Bindung an den sIL-6R; es konnte jedoch auch für die unselektierte, 2'-F-Py

Diskussion

modifizierte R1-RNA-Bibliothek Bindung an den sIL-6R beobachtet werden. Die konstanten Regionen der 2'-F-Py-modifizierten R1-RNA-Bibliothek, aus der auch AIR-3 selektiert wurde, scheinen also ebenfalls an den sIL-6R zu binden. Es ist deshalb unklar, ob 2'-F-Py-modifiziertes AIR-3 tatsächlich aufgrund einer korrekten Faltung mit dem sIL-6R interagiert, oder ob es sich um eine Interaktion der im unverkürzten Aptamer vorhandenen konstanten Regionen mit dem Rezeptor handelt (nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Die Selektion von IL-6R D3 bindenden Aptameren erfolgte unter Verwendung natürlicher Nukleotide während des *in vitro*-Transkriptionsschrittes der SELEX. Die Beobachtung, dass 2'-F-Py-modifiziertes RAID3 ohne messbare Konsequenzen für die Affinität des Aptamers weiterhin an den sIL-6R gebunden hatte, war deshalb unerwartet. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Literatur kein Beispiel für ein weiteres Aptamer gefunden werden, dessen postselektive Modifikation ohne Konsequenzen für die Affinität zum Zielmolekül blieb.

Der FRA ermittelte K_d -Wert von $43,6 \pm 2$ nM für die 2'-F-modifizierte Form von RAID3 liegt auf dem Niveau des unverkürzten Aptamers F4 sowie des unmodifizierten RAID3 (Abbildung 37, Tabelle 20).

Die bisherige strukturelle Charakterisierung von RAID3 deutet auf das Vorhandensein eines G-Quadruplexes als strukturbildendes Element der RNA hin. Die Faltung von RAID3 könnte deshalb überwiegend in Abhängigkeit der Guanine erfolgen und weniger stark durch die Pyrimidine beeinflusst werden, als es in anderen Aptameren der Fall ist. Dies würde voraussetzen, dass die 2'-OH-Gruppen der Pyrimidine nicht zwingend für die korrekte Faltung von RAID3 notwendig sind. Insgesamt weist RAID3 GQ2 (Abbildung 28) zwei Pyrimidine (U17 und U21) in den putativen Propellerschleifen der G-Quadruplexes auf. Diese grenzen jedoch jeweils an ein Purin an. Sollten Wasserstoffbrücken durch 2'-OH-Gruppen der Nukleotide in den Propellerschleifen für die Stabilität des G-Quadruplexes notwendig sein, müssten diese von den Purinen gestellt werden, um die korrekte Faltung der 2'-F-Py-modifizierten Variante von RAID3 zu erklären.

Die Charakterisierung von RAID3s (Abbildung 42) zeigte, dass die putativ G-Quadruplex-bildende Region (Tabelle 19) von RAID3 nicht alleine zur Ausbildung eines den sIL-6R bindenden Aptamers befähigt ist. Über die Faltung der terminalen Bereiche des Aptamers liegen zu diesem Zeitpunkt keine Daten vor. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass auch die terminalen Regionen (nt 1-7, nt 31-34) Auswirkungen auf die globale Struktur des Aptamers haben.

Diskussion

Im Gegensatz zur Affinität von RAID3 zum sIL-6R wurde die Stabilität des Aptamers durchaus durch die 2'-F-Py-Modifikation beeinflusst. Die Stabilitätstests wurden in Zellkulturmedium (DMEM/10% FKS) bei 37 °C durchgeführt, um die Aptamere unter Zellkulturbedingungen zu testen. RAID3 wies eine Halbwertszeit von 1-5 Minuten auf und war damit für eine unmodifizierte RNA bereits außergewöhnlich stabil. Dies könnte auf eine für Serumnukleasen wenig zugängliche Struktur hinweisen. Nichtsdestotrotz ist das Aptamer in seiner unmodifizierten Form nicht für den Einsatz in Experimenten in serumhaltigem Medium geeignet. Anders verhielt es sich mit RAID3 2'-F-Py. Das modifizierte Aptamer war erst nach über 24 h zu mehr als 50% degradiert (Abbildung 39). Die verwendeten 2'-F-Py schützten das Aptamer demnach effektiv gegen die Hydrolyse durch Serum-Ribonukleasen. Mitglieder der häufigsten Serumnuklease-Familie, der Ribonuklease A-Familie, schneiden RNA nahezu ausschließlich nach Pyrimidinen¹⁹⁸, weshalb Modifikationen der 2'-Gruppe von Pyrimidinen alleine bereits einen effektiven Schutz der RNA vor Degradation im Serum darstellen.

7 Ausblick

Das Ziel dieser Dissertation, die Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren für die Domäne 3 des Interleukin-6-Rezeptors, konnte verwirklicht werden. Zudem konnten im Verlauf der Charakterisierung des IL-6R D3-bindenden Aptamers RAID3 Erkenntnisse über das Potential G-Quadruplex-ausbildender Aptamere zur postselektiven Modifikation gewonnen werden, die auch für die Stabilisierung weiterer RNA-Aptamere gegenüber RNasen von Bedeutung sein könnten. Dementsprechend bietet die weitere Charakterisierung der Struktur von RAID3 und RAID3 2'-F-Py ein lohnendes Themenfeld.

In diesem Zuge wäre auch die Aufklärung der Bindestelle von RAID3 an der IL-6R D3 und der an der Interaktion beteiligten Struktur motive von großem Interesse. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten Einsichten in den Mechanismus von G-Quadruplex-Protein-Interaktionen erbringen. Auch das rationale Design einer RAID3-Variante, die den IL-6R gegenüber seinem Liganden IL-6 und/oder dem Co-Rezeptor gp130 blockiert, könnte auf diesem Wege gegebenenfalls realisiert werden. Alternativ könnte RAID3 eingesetzt werden, um den durch ihn gebundenen Bereich der IL-6R D3 in einer neuen SELEX zu maskieren.

Beide Themenfelder, Untersuchung der Struktur von RAID3 und Blockierung des IL-6R könnten synergistisch oder aber unabhängig voneinander verfolgt werden und sollen im Folgenden ausführlicher abgehandelt werden.

7.1 Aptamer vermittelte Blockierung des IL-6R/sIL-6R

Die große Anzahl der in klinischen und vorklinischen Studien erzielten Erfolge durch Tocilizumab bzw. sgp130Fc zeigen deutlich das medizinische Potential (s)IL-6R blockierender Inhibitoren^{12,72,78,85-92,97-99}. Aufgrund der Vorteile Nukleinsäure-basierter Liganden gegenüber Proteinen mag es deshalb lohnenswert sein, die Aptamer-vermittelte Blockierung des IL-6R weiter zu verfolgen. Das rationale Design eines auf RAID3 basierenden, blockierenden Aptamers könnte sich nach dessen struktureller Charakterisierung und Identifikation der Bindestelle am IL-6R als möglich erweisen. Es wäre nach jetzigem Erkenntnisstand jedoch erfolgsversprechender, die Selektion eines Aptamers für eine alternative Bindestelle am Rezeptor zu verfolgen.

Ausblick

RAID3 könnte in diesem Zuge genutzt werden, um die Bindestelle des Aptamers in einer weiteren SELEX zu maskieren, in der nur Domäne 2 und 3 des sIL-6R als Zielmolekül verwendet werden. Die Blockierung der RAID3-Bindestelle am sIL-6R würde so die Selektion von Aptameren für eine alternative Region auf der Oberfläche des Rezeptors begünstigen. Die Immobilisierung des IL-6R über RAID3 würde jedoch eine langsame Dissoziation des Aptamers vom Protein während der Inkubations- und Waschschriffe voraussetzen. Die Charakterisierung der Bindungskinetik, K_{on} und K_{off} , von RAID3 wäre also notwendig, um die Erfolgschancen dieser Methode zu evaluieren.

Die Selektion von Aptameren für alternative Epitope wird durch eine Reihe von Faktoren erschwert. SELEX begünstigt die Anreicherung von Aptameren für eine spezifische Position am Zielprotein. Eine Ursache für diese Einschränkung ist das begrenzte Spektrum möglicher chemischer Wechselwirkungen durch Nukleinsäuren. Während Proteine aufgrund der Vielseitigkeit der 20 Aminosäuren das volle Spektrum chemischer Interaktionen abdecken können, weisen Nukleinsäuren eingeschränkte physikochemische Eigenschaften auf. Praktisch lässt sich dies an der Schwierigkeit ablesen, Aptamere für einige Kategorien von Zielproteinen zu selektieren. Generell lassen sich Proteine mit sehr niedrigem isoelektrischen Punkt, solche ohne kationische Regionen sowie sehr flexible oder hoch glycosylierte Proteine als problematische Ziele für die Selektion von Aptameren zusammenfassen¹³⁶.

Einen vielversprechenden Lösungsansatz für diese Herausforderung konnte die Firma SomaLogic mit der Einführung nicht-natürlicher Nukleotide in die Aptamer-Selektion präsentieren.

Die 5-Position von U bzw. dU hat sich dabei als besonders geeignet für die Addition nicht nativer Reste heraus gestellt, da Modifikationen der 5-Position von Pyrimidinen nicht mit der Wasserstoffbrückenbildung der Basen interferieren^{199,200}. Empirisch wurden die besten Ergebnisse durch hydrophobe Reste mit aromatischem Charakter bei der Selektion von Aptameren erzielt. Zyklische, planare Seitenketten erlauben es Aptameren durch hydrophobe Wechselwirkungen, mit ihrem Zielprotein zu interagieren, und ermöglichen so die Selektion von Aptameren für Positionen auf der Proteinoberfläche, die für Nukleinsäuren normalerweise schwer oder gar nicht verfügbar sind²⁰¹. Nicht nur die Interaktion mit dem Zielmolekül, sondern auch intramolekulare Wechselwirkungen zeigen Abweichungen von natürlichen Nukleinsäuren und führen zur Ausbildung neuer Struktur motive^{201,202}

Ausblick

Durch die parallele Selektion von Aptameren mit unterschiedlichen Modifikationen der 5-Position von Uridin konnten bereits Aptamere für Zielproteine selektiert werden, für die vorhergehende SELEX-Experimente scheiterten^{136,203}. Darüber hinaus konnten unter Verwendung 5-Uridin-modifizierter Nukleotide Aptamer-Paare mit Spezifität für zwei alternative Bindestellen am selben Zielprotein wesentlich leichter selektiert werden, als dies üblicherweise durch SELEX ermöglicht wird¹⁰⁸.

Die Verwendung modifizierter 5-Uridine mit Protein-ähnlichen Seitenketten stellt folglich eine Option dar, Aptamere für neue Bindungsstellen am sIL-6R zu selektieren, die potentiell zur Blockierung des IL-6R für dessen Liganden IL-6 oder den Co-Rezeptor gp130 geeignet sind.

Während der PCR konkurrieren die Aptamere direkt um die Ressourcen, z.B. Primer, dNTPs und Polymerase, des PCR-Ansatzes. Auch dieser Faktor kann eine Rolle für die Amplifikationsrate der Aptamere spielen. In der Literatur finden sich viele Beispiele für Optimierungen der Selektionsphase der SELEX^{112,115,122,126,204}. Die Amplifikationsschritte werden jedoch weitestgehend mit Standardlabortechniken durchgeführt. Die Kompartimentierung der PCR durch Verwendung von Emulsions-RT-PCR ist eine Alternative, die direkte Konkurrenz der Oligonukleotide während der Amplifikation zumindest teilweise zu unterbinden²⁰⁵. Die Etablierung von Emulsions-RT-PCR für SELEX-Experimente ist Teil eines fortlaufenden Projektes dieser Arbeitsgruppe und könnte helfen, den Selektionsdruck für Aptamere zumindest teilweise von den Amplifikationsschritten zu entkoppeln. Die Emulsions-RT-PCR erlaubt die Kompartimentierung der Nukleinsäure-Bibliothek und deren räumlich getrennte Amplifikation nach dem Selektions-Schritt in 10^9 - 10^{10} Micellen. Besonders in den frühen Selektionszyklen mit hoher Diversität der Nukleinsäure-Bibliothek und geringer Edukt-Konzentration nach der Elution vom Zielmolekül konkurrieren so nur wenige oder gar keine Nukleinsäure-Spezies untereinander um die Ressourcen einer Micelle.

7.2 Charakterisierung der Struktur von RAID3

Die Beobachtung, dass RAID3 auch 2'-F-Py-modifiziert mit hoher Affinität an den sIL-6R bindet, impliziert eine Struktur des Aptamers, die, zumindest bis zu einem gewissen Grad, unabhängig von direkten Interaktionen der 2'-OH-Gruppen der Pyrimidine ausgebildet wird. Eine detailliertere Charakterisierung des Aptamers sowohl in seiner modifizierten als auch nicht

Ausblick

modifizierten Form ist jedoch notwendig, um die noch offenstehenden Fragen zur Struktur von RAID3 zu beantworten.

Aufgrund der schlechten Ausbeute und Artefakt-Bildung in der *in vitro*-Transkription von RAID3 2'-F-Py konnten bisher keine CD-Messungen oder anders geartete Versuche zur strukturellen Charakterisierung des modifizierten Aptamers durchgeführt werden. Die Festphasensynthese von RAID3 2'-F-Py wäre deshalb notwendig, um die ausstehenden Experimente durchführen und aufzuklären zu können, ob die Modifikation des Aptamers durch 2'-F-Py Auswirkungen auf dessen Faltung hat.

Die nicht-bindende Variante RAID3s (Abbildung 42) hat bisher nur unzureichend beantwortete Fragen zum Einfluss der 5'- und 3'-terminalen Region von RAID3 auf die Struktur des aktiven Aptamers aufgeworfen. In RAID3 wurden die korrespondierenden Basen (1-7, 31-34) dieser Region in Relation zu dem unverkürzten Ausgangsaptamer F4 zwar ausgetauscht, die Komplementarität der Nukleotide zueinander wurde jedoch aufrechterhalten (Abbildung 24).

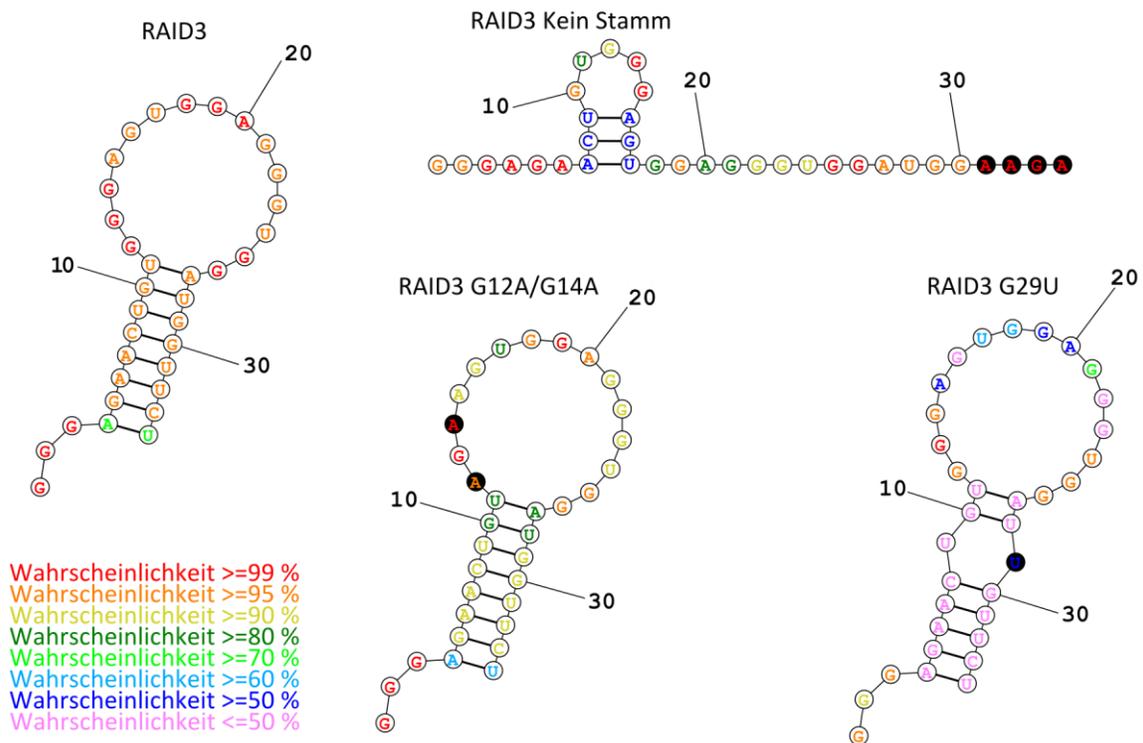


Abbildung 44: Sekundärstrukturvorhersage durch RNAstructure verschiedener RAID3-Varianten. Die Wahrscheinlichkeit für die Ausformung der prognostizierten Sekundärstrukturmotive ist farbkodiert angegeben. Basensubstitutionen in Relation zu RAID3 sind schwarz hinterlegt.

Ausblick

Die Beobachtung, dass RAID3s nicht mehr zur Bindung des sIL-6R in der Lage ist, deutet darauf hin, dass das Vorhandensein komplementärer Basen in der terminalen Region für die korrekte Faltung des Aptamers erforderlich sind. Die Substitution von Nukleotiden am 3'-Terminus von RAID3 zur Aufhebung der Basenkomplementarität wäre eine Option für die weitere strukturelle Charakterisierung des Aptamers. Der Austausch der UUCU-Region gegen AAGA am 3'-Terminus sollte die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren zwischen 5'- und 3'-terminalen Nukleotiden verhindern (Abbildung 44); die daraus resultierenden Folgen für die Affinität des Aptamers könnten dann in Bindungstests überprüft werden.

Ebenfalls noch unklar ist, welche Basen für die Ausbildung des putativen G-Quadruplexes verantwortlich sind. Die Software QGRS-Mapper prognostizierte drei generell mögliche Quadruplex-Topologien für RAID3 (Abbildung 28). Alle bisherigen Ergebnisse deuten auf die Ausbildung des GQ2 hin. Die Substitution von G29 gegen U könnte genutzt werden, um die Ausbildung der putativen Varianten GQ2 und 3 zu verhindern (Abbildung 44). Die Ausbildung des GQ1 könnte durch die Variante RAID3 G12A/G14A ausgeschlossen werden (Abbildung 44). Allerdings sind die Guanine 12 und 14 nach der momentanen Modellvorstellung an der Ausbildung einer flexiblen Region zwischen C8 und U17 beteiligt, die die Interaktion des Aptamers mit dem IL-6R vermitteln könnte. RAID3 G12A/G14A könnte deshalb auch bei Ausbildung des Q-Quadruplexes GQ2 inaktiv sein.

Bindungstests und CD-Spektroskopie dieser und weiterer Varianten, in denen potentiell Quadruplex-bildende Guanine ausgetauscht werden, könnten in ihrer Summe ein genaueres Abbild der Quadruplextopologie von RAID3 ergeben.

Neben dem gezielten Austausch einzelner Nukleotide von RAID3 ließen sich durch *Chemical Probing* weitere Erkenntnisse über die Struktur von RAID3 gewinnen. *Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension* (SHAPE) nutzt Hydroxy-reaktive Elektrophile, die selektiv mit der 2'-OH-Gruppe flexibler Nukleotide reagieren. Die Reaktionsrate von *N*-Methylisatin-säureanhydrid (NMIA) mit dem 2'-OH der Ribose ist proportional zur lokalen Flexibilität der Nukleotide und erfolgt nicht an Positionen, die in kanonischen Watson-Crick-Basenpaarungen involviert sind. Darüber hinaus reagieren auch Nukleotide, die an Strukturen höherer Ordnung beteiligt sind, z.B. Hoogsten-Basenpaarungen, Schleife-Schleife-Interaktionen oder Basentriplets, nicht mit NMIA^{206,207}.

Ausblick

Nach Inkubation der RNA mit dem SHAPE-Reagenz, wird durch eine Primerextensionsreaktion unter Verwendung einer reversen Transkriptase die cDNA der zu untersuchenden RNA synthetisiert. Die DNA-Synthese bricht bei Erreichen des Enzyms an einem 2'-O-Addukt der SHAPE-Reaktion ab; die entstehenden Fragmente können dann durch ein Sequenzier-Gel analysiert werden.

Die SHAPE-Analyse von RAID3 wäre vor allem für die Charakterisierung der Regionen um den putativen G-Quadruplex sowie den 5'- und 3'-Terminus interessant. So wären im Falle der in GQ2 prognostizierten Topologie (Abbildung 28) und einem partiell ausgebildeten Stamm zwischen 5'- und 3'-Terminus (A4-A7; U31-U34) flexible Regionen zwischen C8 und U17 möglich, die unter Umständen für die Interaktion mit dem sIL-6R zur Verfügung stehen würden. In diesem Zusammenhang wäre auch die Durchführung von SHAPE-Experimenten mit freiem Aptamer sowie in Anwesenheit des Zielproteins möglich, um Hinweise auf mögliche Konformationsänderungen des Aptamers im Zuge der sIL-6R-Bindung nachvollziehen zu können. In der vorliegenden Literatur finden sich keine Hinweise auf die Untersuchung von RNA-Quadruplexen durch SHAPE. Die Reaktivität der die Tetraden verbindenden Propellerschleifen mit NMIA ist deshalb unbekannt und könnte zusätzlich interessante Ansätze für die Untersuchung anderer putativ G-Quadruplex-formender RNA bedeuten.

Die Position der Interaktion von RAID3 mit dem sIL-6R könnte durch Quervernetzen der RNA mit dem Protein bestimmt werden. UV-induziertes Quervernetzen erlaubt die kovalente Verknüpfung von Nukleobasen, die sich in enger räumlicher Nähe zu Aminosäuren befinden. Die Durchführung einer Primerextension mit reverser Transkriptase und ³²P-markiertem DNA-Primer erlaubt die Identifikation derjenigen Region innerhalb der RNA, die mit dem Zielprotein interagiert²⁰⁸.

Die Bindestelle der RNA auf Proteinseite kann massenspektrometrisch nach tryptischer Hydrolyse des Proteins und Degradation der RNA identifiziert werden²⁰⁹.

Gemeinsam könnten die in diesem Kapitel zusammengefassten Methoden genutzt werden, um das in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Martin Zacharias erstellte Model von RAID3 zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen. Anhand der durch die SAXS-Struktur gegebenen Referenz der räumlichen Ausdehnung von RAID3 wäre durch *Chemical Probing* und Charakterisierung weiterer RAID3-Varianten eine recht genaue strukturelle Charakterisierung des Aptamers möglich.

Ausblick

8 Literatur

1. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta***1813**, 878–88 (2011).
2. Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.***374**, 1–20 (2003).
3. Liu, F., Poursine-Laurent, J., Wu, H. Y. & Link, D. C. Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. *Blood***90**, 2583–2590 (1997).
4. Hunter, C. a & Jones, S. a. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Publ. Gr.***16**, 448–457 (2015).
5. Yasukawa, K. *et al.* Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.***6**, 2939–2945 (1987).
6. Woloski, B. M. & Fuller, G. M. Identification and partial characterization of hepatocyte-stimulating factor from leukemia cell lines: comparison with interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***82**, 1443–1447 (1985).
7. Naka, T., Nishimoto, N. & Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.***4 Suppl 3**, S233–S242 (2002).
8. Masuda, K. *et al.* Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***110**, 9409–14 (2013).
9. Sugimoto, T. *et al.* Clock gene Per1 regulates the production of CCL2 and interleukin-6 through p38, JNK1 and NF- κ B activation in spinal astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.***59**, 37–46 (2014).
10. Viswanathan, S. R. *et al.* Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.***41**, 843–848 (2009).
11. Scheller, J., Garbers, C. & Rose-John, S. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin. Immunol.***26**, 2–12 (2014).
12. Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H. & Morris, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: A strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.***24**, 163–173 (2013).

Literatur

13. Boulanger, M. J., Chow, D., Brevnova, E. E. & Garcia, K. C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science***300**, 2101–2104 (2003).
14. Varghese, J. N. *et al.* Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***99**, 15959–15964 (2002).
15. Özbek, S. *et al.* The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association. *J. Biol. Chem.***273**, 21374–21379 (1998).
16. Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. & Rose-John, S. A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding. *Eur. J. Biochem.***263**, 438–446 (1999).
17. Wiesinger, M. Y. *et al.* Development of an IL-6 Inhibitor Based on the Functional Analysis of Murine IL-6R α 1. *Chem. Biol.***16**, 783–794 (2009).
18. Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C. & Graeve, L. The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Cell Sci.***113 (Pt 2)**, 3593–3602 (2000).
19. Owczarek, C. M. *et al.* The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor β -chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J. Biol. Chem.***272**, 23976–23985 (1997).
20. Hammacher, A. *et al.* The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J. Biol. Chem.***273**, 22701–22707 (1998).
21. Kurth, I. *et al.* Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J. Immunol.***162**, 1480–1487 (1999).
22. Schroers, A. *et al.* Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci.***14**, 783–790 (2005).
23. Hammacher, a. Influence of Interleukin-6 (IL-6) Dimerization on Formation of the High Affinity Hexameric IL-6 Receptor Complex. *J. Biol. Chem.***271**, 20138–20144 (1996).
24. Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K. J. & Rose-John, S. IL-6 type cytokine receptor complexes: Hexamer, tetramer or both? *Biol. Chem.***380**, 803–813 (1999).
25. Kurth, I. *et al.* Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J. Immunol.***164**, 273–282 (2000).

Literatur

26. Hammacher, A. *et al.* Ligand-specific utilization of the extracellular membrane-proximal region of the gp130-related signalling receptors. *Biochem. J.***345 Pt 1**, 25–32 (2000).
27. Timmermann, A., Küster, A., Kurth, I., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. *Eur. J. Biochem.***269**, 2716–2726 (2002).
28. Giese, B. *et al.* Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J. Cell Sci.***118**, 5129–5140 (2005).
29. Tenhumberg, S. *et al.* gp130 dimerization in the absence of ligand: Preformed cytokine receptor complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***346**, 649–657 (2006).
30. Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K., Rose-john, S. & Mainz, J. G. IL-6 Type Cytokine Receptor Complexes : Hexamer , Tetramer or Both ? **380**, 803–813 (1999).
31. Eulenfeld, R. *et al.* Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *Eur. J. Cell Biol.***91**, 486–495 (2012).
32. Stahl, N. *et al.* Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science***263**, 92–95 (1994).
33. Rodig, S. J. *et al.* Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell***93**, 373–383 (1998).
34. Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem. J.***349**, 261–266 (2000).
35. Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.***374**, 1–20 (2003).
36. Lai, C. F. *et al.* Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.***270**, 14847–14850 (1995).
37. Fu, X. Y. & Zhang, J. J. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell***74**, 1135–1145 (1993).
38. Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L. & Schreiber, R. D. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.***13**, 1591–1600 (1994).

Literatur

39. Shuai, K. *et al.* Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell***76**, 821–828 (1994).
40. Uddin, S. *et al.* Protein kinase C- δ (PKC- δ) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J. Biol. Chem.***277**, 14408–14416 (2002).
41. Abe, K. *et al.* The YXXQ motif in gp 130 is crucial for STAT3 phosphorylation at Ser727 through an H7-sensitive kinase pathway. *Oncogene***20**, 3464–3474 (2001).
42. Sancéau, J., Hiscott, J., Delattre, O. & Wietzerbin, J. IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene***19**, 3372–3383 (2000).
43. Schiemann, W. P., Bartoe, J. L. & Nathanson, N. M. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J. Biol. Chem.***272**, 16631–16636 (1997).
44. Schaper, F. *et al.* Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem. J.***335** (Pt 3), 557–565 (1998).
45. Symes, A. *et al.* The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr. Biol.***7**, 697–700 (1997).
46. Kim, H., Hawley, T. S., Hawley, R. G. & Baumann, H. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.***18**, 1525–1533 (1998).
47. Lehmann, U. *et al.* SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J. Biol. Chem.***278**, 661–671 (2003).
48. Gunaje, J. J. & Bhat, G. J. Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***288**, 252–257 (2001).
49. Hsu, J. *et al.* Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses. *Oncogene***21**, 1391–1400 (2002).
50. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. & Schaper, F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.***275**, 12848–12856 (2000).

Literatur

51. Sasaki, A. *et al.* CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.***275**, 29338–29347 (2000).
52. Liu, B. *et al.* Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***95**, 10626–10631 (1998).
53. Chung, C. D. *et al.* Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science***278**, 1803–1805 (1997).
54. Alonzi, T. *et al.* Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.***187**, 461–8 (1998).
55. Tackey, E., Lipsky, P. E. & Illei, G. G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus***13**, 339–343 (2004).
56. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.***52**, 199–219 (2012).
57. Screpanti, I. *et al.* Inactivation of the IL-6 gene prevents development of multicentric Castleman's disease in C/EBP beta-deficient mice. *J. Exp. Med.***184**, 1561–1566 (1996).
58. Li, N., Grivennikov, S. I. & Karin, M. The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape The Cancer Microenvironment. *Cancer Cell***19**, 429–431 (2011).
59. Suchi, K. *et al.* Overexpression of interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res.***31**, 67–75 (2011).
60. Sierra, A. Metastases and their microenvironments: Linking pathogenesis and therapy. *Drug Resist. Updat.***8**, 247–257 (2005).
61. Schöbitz, B. *et al.* Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J.***9**, 659–664 (1995).
62. Bernad, A. *et al.* Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity***1**, 725–731 (1994).
63. Glund, S. *et al.* Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes***56**, 1630–1637 (2007).
64. McFarland-Mancini, M. M. *et al.* Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J. Immunol.***184**, 7219–7228 (2010).
65. Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A. & Castro-Muñozledo, F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.***325**, 77–90 (2006).

Literatur

66. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.***6**, a016295–a016295 (2014).
67. Giri, J. G. *et al.* Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *J. Immunol.***153**, 5802–5809 (1994).
68. Rose-John, S. & Heinrich, P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.***300**, 281–290 (1994).
69. Reddy, P. Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.***275**, 14608–14614 (2000).
70. Jones, S. a, Scheller, J. & Rose-john, S. Science in medicine Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6 / gp130 signaling. *Cell***121**, 3375–3383 (2011).
71. Jones, G. W. *et al.* Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J. Immunol.***184**, 2130–2139 (2010).
72. Atreya, R. *et al.* Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.***6**, 583–588 (2000).
73. Müllberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.***23**, 473–480 (1993).
74. Matthews, V. *et al.* Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.***278**, 38829–38839 (2003).
75. Chalaris, A. *et al.* Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood***110**, 1748–55 (2007).
76. Müller-Newen, G. *et al.* Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J. Immunol.***161**, 6347–6355 (1998).
77. Narazaki, M. *et al.* Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood***82**, 1120–1126 (1993).
78. Nowell, M. a *et al.* Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J. Immunol.***171**, 3202–3209 (2003).

Literatur

79. Kyrstsonis, M. C., Dedoussis, G., Baxevanis, C., Stamatelou, M. & Maniatis, A. Serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-4 (IL-4) in patients with multiple myeloma (MM). *Br. J. Haematol.***92**, 420–422 (1996).
80. Zeni, F. *et al.* Soluble interleukin-6 receptor in patients with severe sepsis. *J. Infect. Dis.***172**, 607–608 (1995).
81. Lu, Z. Y. *et al.* High amounts of circulating interleukin (IL)-6 in the form of monomeric immune complexes during anti-IL-6 therapy. Towards a new methodology for measuring overall cytokine production in human in vivo. *Eur. J. Immunol.***22**, 2819–2824 (1992).
82. Montero-Julian, F. A., Klein, B., Gautherot, E. & Brailly, H. Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies. *Blood***85**, 917–924 (1995).
83. Sato, K. *et al.* Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.***53**, 851–856 (1993).
84. Shetty, A. *et al.* Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. *Drug Des. Devel. Ther.***8**, 349–364 (2014).
85. Finzel, S. *et al.* Interleukin-6 receptor blockade induces limited repair of bone erosions in rheumatoid arthritis: a micro CT study. *Ann. Rheum. Dis.***72**, 396–400 (2013).
86. Singh, J. A., Beg, S. & Lopez-Olivo, M. A. Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J. Rheumatol.***38**, 10–20 (2011).
87. Illei, G. G. *et al.* Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: Data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum.***62**, 542–552 (2010).
88. Ito, H. *et al.* A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterology***126**, 989–996 (2004).
89. Nishimoto, N. *et al.* Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood***106**, 2627–2632 (2005).
90. Shinriki, S. *et al.* Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.***15**, 5426–5434 (2009).
91. Shinriki, S. *et al.* Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J. Pathol.***225**, 142–150 (2011).

Literatur

92. Yoshio-Hoshino, N. *et al.* Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor. *Cancer Res.***67**, 871–875 (2007).
93. Hoge, J. *et al.* IL-6 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes* via Classical IL-6 Signaling. *J. Immunol.***190**, 703–711 (2012).
94. Jostock, T. *et al.* Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.***268**, 160–167 (2001).
95. Jones, S. A., Scheller, J. & Rose-john, S. Science in medicine Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6 / gp130 signaling. **121**, (2011).
96. Barkhausen, T. *et al.* Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit. Care Med.***39**, 1407–1413 (2011).
97. Tsantikos, E. *et al.* Interleukin-6 trans-signaling exacerbates inflammation and renal pathology in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.***65**, 2691–2702 (2013).
98. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell***15**, 103–113 (2009).
99. Becker, C. *et al.* TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity***21**, 491–501 (2004).
100. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. a. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science***289**, 920–930 (2000).
101. Robertson, M. P. & Joyce, G. F. The origins of the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.***4**, 1 (2012).
102. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science***249**, 505–510 (1990).
103. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature***346**, 818–822 (1990).
104. Foy, J. W.-D., Rittenhouse, K., Modi, M. & Patel, M. Local tolerance and systemic safety of pegaptanib sodium in the dog and rabbit. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.***23**, 452–66 (2007).
105. Zhu, G. *et al.* Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy. *Chem. Commun.***48**, 10472 (2012).
106. Wallukat, G. *et al.* The First Aptamer-Apheresis Column Specifically for Clearing Blood of $\alpha\beta_1$ -Receptor Autoantibodies. *Circ. J.***76**, (2012).

Literatur

107. Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. Aptamer-based colorimetric probe for cocaine. *J. Am. Chem. Soc.***124**, 9678–9679 (2002).
108. Ochsner, U. a., Green, L. S., Gold, L. & Janjic, N. Systematic selection of modified aptamer pairs for diagnostic sandwich assays. *Biotechniques***56**, 125–133 (2014).
109. Sun, H. *et al.* Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids***3**, e182 (2014).
110. Shigdar, S. *et al.* Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. *Sensors (Basel)***13**, 13624–13637 (2013).
111. Ferreira, C. S. M., Matthews, C. S. & Missailidis, S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol.***27**, 289–301 (2006).
112. Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y. & Coffey, D. S. Correction: Identification and Characterization of Nuclease-Stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-Specific Membrane Antigen. *Cancer Res.***72**, 3887–3887 (2012).
113. Kim, S. J., Kim, M. Y., Lee, J. H., You, J. C. & Jeong, S. Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***291**, 925–931 (2002).
114. Tang, Z. *et al.* Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Anal. Chem.***79**, 4900–4907 (2007).
115. Cheng, C., Chen, Y. H., Lennox, K. a, Behlke, M. a & Davidson, B. L. In vivo SELEX for Identification of Brain-penetrating Aptamers. *Mol. Ther. Nucleic Acids***2**, e67 (2013).
116. Szeitner, Z., András, J., Gyurcsányi, R. E. & Mészáros, T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.***101**, 58–65 (2014).
117. Song, K.-M., Lee, S. & Ban, C. Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)***12**, 612–31 (2012).
118. Cox, J. C., Rudolph, P. & Ellington, A. D. Automated RNA selection. *Biotechnol. Prog.***14**, 845–850 (1998).
119. Oh, S. S. *et al.* Generation of highly specific aptamers via micromagnetic selection. *Anal. Chem.***81**, 5490–5 (2009).
120. Tok, J., Lai, J., Leung, T. & Li, S. F. Y. Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis***31**, 2055–2062 (2010).

Literatur

121. Turgeon, R. T. & Bowser, M. T. Micro free-flow electrophoresis: Theory and applications. *Anal. Bioanal. Chem.***394**, 187–198 (2009).
122. Jing, M. & Bowser, M. T. Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis. *Lab Chip***11**, 3703 (2011).
123. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.***126**, 20–21 (2004).
124. Wiegand, T. W. *et al.* High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J. Immunol.***157**, 221–230 (1996).
125. Yan, A. & Levy, M. Cell internalization SELEX: In vitro selection for molecules that internalize into cells. *Methods Mol. Biol.***1103**, 241–265 (2014).
126. Ruckman, J. *et al.* 2⁻Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF 165). **273**, 20556–20567 (1998).
127. Müller, J., El-Maarri, O., Oldenburg, J., Pötzsch, B. & Mayer, G. Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.***390**, 1033–7 (2008).
128. Bailey, T. L. *et al.* MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.***37**, 202–208 (2009).
129. Meyer, C. *et al.* Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers. **130**, 57–65 (2014).
130. Kruspe, S., Mittelberger, F., Szameit, K. & Hahn, U. Aptamers as Drug Delivery Vehicles. *ChemMedChem***9**, 1998–2011 (2014).
131. Keefe, A. D. & Cload, S. T. SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.***12**, 448–456 (2008).
132. Vester, B. & Wengel, J. Current Topics LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary. *October***43**, 13233–41 (2004).
133. Wlotzka, B. *et al.* In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***99**, 8898–8902 (2002).
134. Eulberg, D. & Klussmann, S. Spiegelmers: Biostable aptamers. *ChemBioChem***4**, 979–983 (2003).

Literatur

135. Thiel, K. W. & Giangrande, P. H. Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers. *Ther. Deliv.***1**, 849–861 (2010).
136. Rohloff, J. C. *et al.* Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents. *Mol. Ther. Acids***3**, e201 (2014).
137. Viores, S. a. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int. J. Nanomedicine***1**, 263–268 (2006).
138. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.***9**, 537–50 (2010).
139. Ng, E. W. M. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.***5**, 123–32 (2006).
140. Chan, M. Y. *et al.* Phase 1b randomized study of antidote-controlled modulation of factor IXa activity in patients with stable coronary artery disease. *Circulation***117**, 2865–2874 (2008).
141. Hoellenriegel, J. *et al.* The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood***123**, 1032–1039 (2014).
142. Su, S. L., Huang, I. P., Fair, W. R., Powell, C. T. & Heston, W. D. W. Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: Ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer Res.***55**, 1441–1443 (1995).
143. McNamara, J. O. *et al.* Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.***24**, 1005–1015 (2006).
144. Dassie, J. P. *et al.* Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol.***27**, 839–849 (2009).
145. Shi, H., Fan, X., Sevilimedu, A. & Lis, J. T. RNA aptamers directed to discrete functional sites on a single protein structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***104**, 3742–3746 (2007).
146. Gong, Q. *et al.* Selection strategy to generate aptamer pairs that bind to distinct sites on protein targets. *Anal. Chem.***84**, 5365–71 (2012).
147. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature***227**, 680–685 (1970).

Literatur

148. Neuhoff, V., Stamm, R. & Eibl, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis***6**, 427–448 (1985).
149. Meyer, C. Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamere. (2009).
150. Meyer, C. *et al.* Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells. *RNA Biol.***9**, 65–78 (2012).
151. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.***16**, 6127–6145 (1988).
152. Hein, J. [39] *Unified approach to alignment and phylogenies. Methods Enzymol.***183**, (1990).
153. Floss, D. M. *et al.* Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *J. Biol. Chem.***288**, 19386–19400 (2013).
154. Daley, G. Q. & Baltimore, D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***85**, 9312–9316 (1988).
155. Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.***35**, (2007).
156. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.***32**, (2004).
157. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***98**, 10037–10041 (2001).
158. Schütze, T. *et al.* Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS One***6**, e29604 (2011).
159. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.***31**, 3406–3415 (2003).
160. Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R. & Hofacker, I. L. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.***36**, 70–74 (2008).
161. Reuter, J. S. & Mathews, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics***11**, 129 (2010).

Literatur

162. Bai, L., Santangelo, T. J. & Wang, M. D. Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.***35**, 343–360 (2006).
163. Jones, S., Daley, D. T., Luscombe, N. M., Berman, H. M. & Thornton, J. M. Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res.***29**, 943–954 (2001).
164. Ivanov, S. a, Welz, R., Gottikh, M. B. & Muller, S. RNA synthesis by T7 RNA polymerase supported primer extension. *Mol Biol***38**, 798–803 (2004).
165. Kikin, O., D'Antonio, L. & Bagga, P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.***34**, W676–82 (2006).
166. Zhang, A. Y. Q. & Balasubramanian, S. The kinetics and folding pathways of intramolecular G-quadruplex nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.***134**, 19297–308 (2012).
167. Phan, A. T. Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences. *FEBS J.***277**, 1107–1117 (2010).
168. Balagurumoorthy, P., Brahmachari, S. K., Mohanty, D., Bansal, M. & Sasisekharan, V. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences. *Nucleic Acids Res.***20**, 4061–7 (1992).
169. Mitsuoka, Y. *et al.* A bridged nucleic acid, 2',4'-BNACOC: synthesis of fully modified oligonucleotides bearing thymine, 5-methylcytosine, adenine and guanine 2',4'-BNACOC monomers and RNA-selective nucleic-acid recognition. *Nucleic Acids Res.***37**, 1225–1238 (2008).
170. Mittelberger, F. *et al.* RAID3 - An interleukin-6 receptor-binding aptamer with post-selective modification-resistant affinity. *RNA Biol.***12**, 1043–1053 (2015).
171. Lavery, R., Zakrzewska, K. & Sklenar, H. JUMNA (junction minimisation of nucleic acids). *Comput. Phys. Commun.***91**, 135–158 (1995).
172. Zacharias, M. Conformational analysis of DNA-trinucleotide-hairpin-loop structures using a continuum solvent model. *Biophys. J.***80**, 2350–2363 (2001).
173. Cornell, W. D. *et al.* A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.***117**, 5179–5197 (1995).
174. Liu, H., Matsugami, A., Katahira, M. & Uesugi, S. A dimeric RNA quadruplex architecture comprised of two G:G(:A):G:G(:A) hexads, G:G:G:G tetrads and UUUU loops. *J. Mol. Biol.***322**, 955–970 (2002).

Literatur

175. Sorrentino, S. The eight human 'canonical' ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.***584**, 2194–2200 (2010).
176. Ellington, a D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature***346**, 818–822 (1990).
177. Holeman, L. a., Robinson, S. L., Szostak, J. W. & Wilson, C. Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold. Des.***3**, 423–431 (1998).
178. Binning, J. M., Leung, D. W. & Amarasinghe, G. K. Aptamers in virology: Recent advances and challenges. *Front. Microbiol.***3**, 1–6 (2012).
179. Ozer, A., White, B. S., Lis, J. T. & Shalloway, D. Density-dependent cooperative non-specific binding in solid-phase SELEX affinity selection. *Nucleic Acids Res.***41**, 7167–7175 (2013).
180. Ellis, J. J., Broom, M. & Jones, S. Protein-RNA interactions: Structural analysis and functional classes. *Proteins Struct. Funct. Genet.***66**, 903–911 (2007).
181. Jeong, E., Kim, H., Lee, S.-W. & Han, K. Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes. *Mol. Cells***16**, 161–167 (2003).
182. Lejeune, D., Delsaux, N., Charlotiaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure. *Proteins***61**, 258–271 (2005).
183. Mullen, M. a, Assmann, S. M. & Bevilacqua, P. C. Toward a digital gene response: RNA G-quadruplexes with fewer quartets fold with higher cooperativity. *J. Amer. Chem. Soc.***134**, 812–815 (2012).
184. Xu, Y., Kaminaga, K. & Komiyama, M. Human Telomeric RNA in G-quadruplex Structure. *Nucleic Acids Symp. Ser.***52**, 175–176 (2008).
185. Neidle, S. *Copyright. Ther. Appl. Quadruplex Nucleic Acids* (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-375138-6.00013-3
186. Zhang, D. H. *et al.* Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors. *Biochemistry***49**, 4554–4563 (2010).
187. Palacios, R. & Steinmetz, M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell***41**, 727–734 (1985).

Literatur

188. Warmuth, M., Kim, S., Gu, X., Xia, G. & Adrián, F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr. Opin. Oncol.***19**, 55–60 (2007).
189. Schuster, B., Meinert, W., Rose-John, S. & Kallen, K. J. The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS Lett.***538**, 113–116 (2003).
190. Podar, K. *et al.* Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.***278**, 5794–5801 (2003).
191. Sehgal, P. B. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochim. Pol.***50**, 583–594 (2003).
192. Sehgal, P. B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V. & Patel, K. Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J. Biol. Chem.***277**, 12067–12074 (2002).
193. Adler, A., Forster, N., Homann, M. & Göringer, H. U. Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer. *Comb. Chem. High Throughput Screen.***11**, 16–23 (2008).
194. Huang, M., Giese, T. J., Lee, T.-S. & York, D. M. Improvement of DNA and RNA Sugar Pucker Profiles from Semiempirical Quantum Methods. *J. Chem. Theory Comput.***10**, 1538–1545 (2014).
195. Wohlrab, F., Haertlé, T., Trichtinger, T. & Guschlbauer, W. 2'-Deoxy-2'-fluorouridine-5'-phosphate: an alternative substrate for thymidylate synthetase from *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.***5**, 4753–4759 (1978).
196. Patra, A. *et al.* 2'-fluoro RNA shows increased Watson-Crick H-bonding strength and stacking relative to RNA: Evidence from NMR and thermodynamic data. *Angew. Chemie - Int. Ed.***51**, 11863–11866 (2012).
197. Pan, W. *et al.* Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. **92**, 11509–11513 (1995).
198. Beintema, J. J. & Kleinedam, R. G. The ribonuclease A superfamily: General discussion. *Cell. Mol. Life Sci.***54**, 825–832 (1998).
199. Eaton, B. E. & Pieken, W. a. Ribonucleosides and RNA. *Annu. Rev. Biochem.***64**, 837–63 (1995).
200. Hollenstein, M., Hipolito, C. J., Lam, C. H. & Perrin, D. M. A DNAzyme with three protein-like functional groups: Enhancing catalytic efficiency of Mg²⁺-independent RNA cleavage. *ChemBioChem***10**, 1988–1992 (2009).

Literatur

201. Davies, D. R. *et al.* Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19971–6 (2012).
202. Gelinas, A. D. *et al.* Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand. *J. Biol. Chem.* **289**, 8720–34 (2014).
203. Gold, L. *et al.* Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One* **5**, (2010).
204. Mann, A. P. *et al.* Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: Potential application for inflamed vasculature targeting. *PLoS One* **5**, 1–11 (2010).
205. Levay, A. *et al.* Identifying high-affinity aptamer ligands with defined cross-reactivity using high-throughput guided systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Nucleic Acids Res.* **43**, e82–e82 (2015).
206. Weeks, K. M. Advances in RNA Secondary and Tertiary Structure Analysis by Chemical Probing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 295–304 (2010).
207. Merino, E. J., Wilkinson, K. a., Coughlan, J. L. & Weeks, K. M. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4223–4231 (2005).
208. Urlaub, H., Hartmuth, K., Kostka, S., Grelle, G. & Lührmann, R. A general approach for identification of RNA-protein cross-linking sites within native human spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs): Analysis of RNA-protein contacts in native U1 and U4/U6.U5 snRNPs. *J. Biol. Chem.* **275**, 41458–41468 (2000).
209. Kramer, K. *et al.* Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **11**, (2014).

Danksagung

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn für die Bereitstellung dieses Themas, dass er sich stets Zeit genommen und mir ermöglicht hat, meine eigenen Ideen zu verwirklichen.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Chris Meier für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Cindy Meyer für die Einführung in das Thema, die vielen interessanten Diskussionen und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Prof. Dr. Stefan Rose-John und Dr. Inken Lorenzen von der Universität Kiel sowie Dr. Georg Waetzig von der Conaris Resarch AG für die sehr gute Zusammenarbeit beim IL-6R-Aptamere-Projekt bedanken.

Ich danke auch Dr. Ingo Fritz, Dr. Jörn Glökler und Philip Franke für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung eines SELEX-Kits.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Zacharias für die anregenden Diskussionen und das Erstellen eines räumlichen Modells von RAID3 sowie bei Dimitri Svergun und Erica Valentini für Erstellung der SAXS-Strukturen des Aptamers.

Mein Dank gilt auch Anna Rath, Sven Kruspe, Stephanie Besztejan und Katrin Seelhorst für das Korrekturlesen meines Erstautoren-Papers beziehungsweise dieser Arbeit. Ich möchte mich auch bei Katharina Berg für die tolle Labornachbarschaft und bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hahn und der Arbeitsgruppe Rentmeister für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit bedanken.

Auch bei meinen studentischen Praktikanten Suki, Agnes, Sara, Susann, Mohammad, Timo und Franceskosowie meinen BTA-Schülern Eva, Anna, Julian, Kim, Tom, Jasper, Eleonore, Daria und Jaqueline möchte ich mich für die Unterstützung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich immer unterstützt haben.

10 Anhang

10.1 GHS-Gefahrstoffverordnung

Piktogramm	Bezeichnung	Signalwort	Gefahrenklasse
	GHS01 Explodierende Bombe	Gefahr	Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	GHS02 Flamme	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	GHS03 Flamme über einem Kreis	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	GHS04 Gasflasche	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	GHS05 Ätzwirkung	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	GHS06 Totenkopf mit gekreuzten Knochen	Gefahr	Akute Toxizität
	GHS07 Ausrufezeichen	Achtung	gesundheitsschädlich (akute Toxizität Kat. 4), STOT* Kat. 3, ätzend Kat. 2, hautsensibilisierend

Anhang

	GHS08 Gesundheitsgefahr	Gefahr	Krebserzeugend, Mutagen, Reproduktionstoxisch, STOT* Kategorie 1 und 2, Atemwegssensibilisierend
	GHS09 Umwelt	Gefahr/ Achtung	Gewässergefährdend

*STOT – gezielte Organtoxizität (*specific target organ toxicity*)

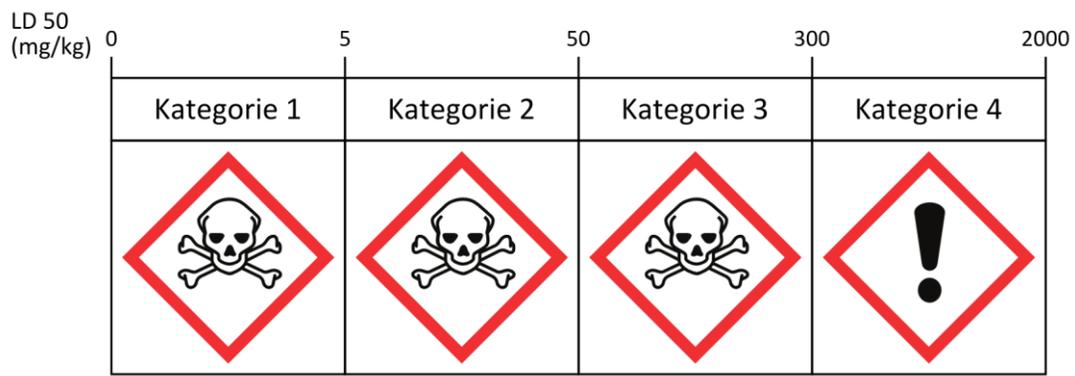


Abbildung 45: Einstufungskriterien für die akute Toxizität (oral)

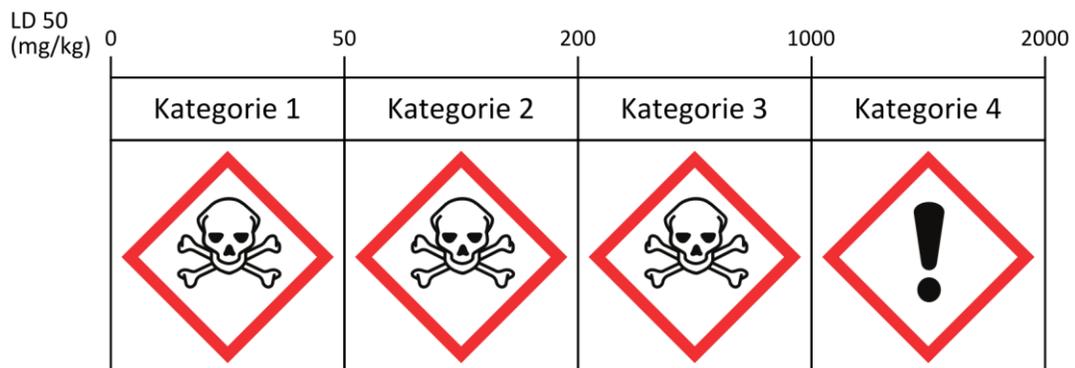


Abbildung 46: Einstufungskriterien für die akute Toxizität (dermal)

Anhang

10.2 H-Sätze

Code	Phrase
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H301 + H311 + H331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H302 + H332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen
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.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
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.

Anhang

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
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370	Schädigt die Organe
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Anhang

10.3 P-Sätze

Code	Phrase
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P301 + P312	BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P301 + P330 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
P302 + P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasserwaschen.
P303 + P361 + P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304 + P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P304 + P341	BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305 + P351 + P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P308 + P310	BEI Exposition oder falls betroffen: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.

Anhang

P308 + P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309 + 310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342 + P311	Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/.../anrufen.
P352	Mit viel Wasser waschen.
P406	In korrosionsbeständigem Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.

Anhang

10.4 Gefahrenstoffinformationen

Gefahrstoff	Gefahrensymbole	H-Sätze	P-Sätze
6-Amino-hexansäure		H315-H319-H335	P261-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P304+P340
Acrylamid		H301-H312-H315-H317-H319-H332-H340-H350-H361f-H372	P280-P302+P352-P305+P351+P338
Ammoniumper-oxodisulfat		H272-H302-H315-H317-H319-H334-H335	P280-P305+P351+P338-P302+P352-P304+P341-P342+P311
Ampicillin-Natriumsalz		H317-H334	P261-P280-P342+P311
BCIP		H315-H319-H335	P261-P280-P301+P312-P304+P340
Bisacrylamid		H302	
Dithiothreitol		H302-H315-H319-H335	P261-P280-P301+P312-P304+P340
Essigsäure		H226-H314	P280-P301+P330+P331-P305+P351+P338
Ethanol		H225	P210-P233
Ethidiumbromid		H332-H341	P281-P308+P313
Formaldehyd		H301-H311-H314-H317-H331-H351-H370-H335	P281--P308+ P310-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338
Glutardialdehyd		H331-H301-H314-H334-H317-H400	P280-P305+P351P+338-P270-P260-P273-P308+P313
Isopropanol		H225-H319-H336	P210-P233-P305+P351+P338

Anhang

Gefahrstoff	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Methanol		H225-H301+H311+H331-H370	P210-P280-P233-P302+P352-P309+P310
Natriumdodecylsulfat		H228-H302+H332-H315-H318-H335-H412	P210-P280-P302+P352-P304+P340-P305+P351+P338-P314
Natriumhydroxid		H290-H314	P280-P303+P361+P353-P301+P330+P331-P305+P351+P338-P309+P310-P406
NBT		H302-H319	P280-P301+P312-P305+P351+P338
Penicillin G		H317	P280
Salzsäure (konz.)		H290-H314-H335	P280-P301+P330+P331-P305+P351+P338
Silbernitrat		H315-H319-H412	P280-P273-P302+P352-P305+P351+P338-P337+P313
Streptomycin		H302	
Tetramethyl-ethylendiamin		H225-H302-H314-H332	P210-P233-P280-P301+P330+P331-P305+P351+P338
Tris		H315-H319-H335	P261-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P304+P340
Trypanblau		H350	P201-P308+P313
Xylencyanol		H315-H319-H335	

Anhang

10.5 Liste der verwendeten KMR-Stoffe, Kat. 1 & 2

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	30-40%, wässrige Lösungen zur Polymerisation. Verwendete Menge: 50 mL	K1B, M1B, R _F 2
56-65-5	Adenosintriphosphat	radioaktives Isotop (³² P) zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren. Verwendete Menge: 400 µL	
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/mL wässrige Lösung zur Färbung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen. Verwendete Menge: 300 µL	M2
50-00-0	Formaldehyd	37% ige Lösung für die Silberfärbung von Proteingelen. Verwendete Menge: 7,5 µL	K2
68-12-2	N,N Dimethylformamid	Lösungsmittel. Verwendete Menge: 1 mL	R _E 1B

Anhang

10.6 Weitere Nukleinsäuren

Tabelle 21: Sequenzen der randomisierten Kernregion von *E. coli*-Kolonien nach Transformation mit der Nukleinsäure-Bibliothek R1.

Bez.	Sequenz der randomisierten Kernregion	Sequenz-Familie
R1K1	GAAGAGAGAAAGCCAGTAGAGGGAAGAGGGATGAGGGACGTGGGAATCTTGGTAATCAGT	F3
R1K3	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K4	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K5	CTCGCGGCATAGCTGTTTTCAGTAGGGAGGTTAAAAGGGCGGAGGGACGAACAGCTACCGTGA	-
R1K6	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K7	taanGcTACcntctcatCgGCCACGCentTctCtTCGTTCTAGCTCTTCGATCTCTAG	-
R1K8	TAAAAAAACGGCCCATCGTTTGGCACTGTGGGAGTGGAGGGTGGATGGTGTAAAGCGATTGG	F4
R1K9	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K10	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K11	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K12	CTATTTTCTCTGTACACAGAGTCTGCGGGTGGGTGGGTAGGATGGACGGTGTACACTTG	-
R1K13	TAAAAACGGCCCATCGTTTGGCGCTGTGGGAGTGGAGGGTGGATGGTGTAAAGCGATTGG	F4
R1K14	TAAAAACGGCCCATCGTTTGGCGCTGTGGGAGTGGAGGGTGGATGGTGTAAAGCGATTGG	F4
R1K15	AGACGGGAGGTTCGTTTTGGTACCGGAAACTCTTGCCCTCTAGCC	-
R1K16	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTCGTCGCAAGCTGG	F1
R1K17	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K18	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K19	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K20	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K21	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGGC	F1
R1K22	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTCGTCGCAAGCTGG	F1
R1K23	GTGTGGAGTAGGGCGGAGGGAATTTAAGGGTGGTTAATTCACAAGTCTCATTCT	F5
R1K24	ACGATAgTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K26	GAAGAGAGAAAGCCAGTAGAGGGAAGAGGGATGAGGGACGTGGGAATCTTGGTAATCAGT	F3
R1K27	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K28	GATAAAAGAGACATGTGTCTCAGACGCCACCCACCCATCTACCTGCCACATGTGAAC	-
R1K29	CAACGAACTATGAGGAAAGGGACCGTGCAGAGGTTGGGTTAGGGTTTGGAGCCACGGTC	F2
R1K30	GAAGAGAGAAAGCCAGTAGAGGGAAGAGGGATGAGGGACGTGGGAATCTTGGTAATCAGT	F3
R1K31	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K32	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1
R1K33	TCAGAACAGAAGTGGCCTTTGTGAGGGAGGGTGGATGAGGAGTG	-
R1K35	GGTCTGACGGGGCGATCTTAGGTTCCGAAGATGTCGACACTGACAGCACTACACTAGG	-
R1K38	GTGTGGAGTAGGGCGGAGGGAATTTAAGGGTGGTTAATTCACAAGTCTCATTCT	F5
R1K40	GAAGAGAGAAAGCCAGTAGAGGGAAGAGGGATGAGGGACGTGGGAATCTTGGTAATCAGT	F3
R1K41	ACGATAGTGGGGAGGTGAATTAGGGCGGAGGGTATATCGATAGTTTGTGCGCAAGCTGG	F1

Anhang

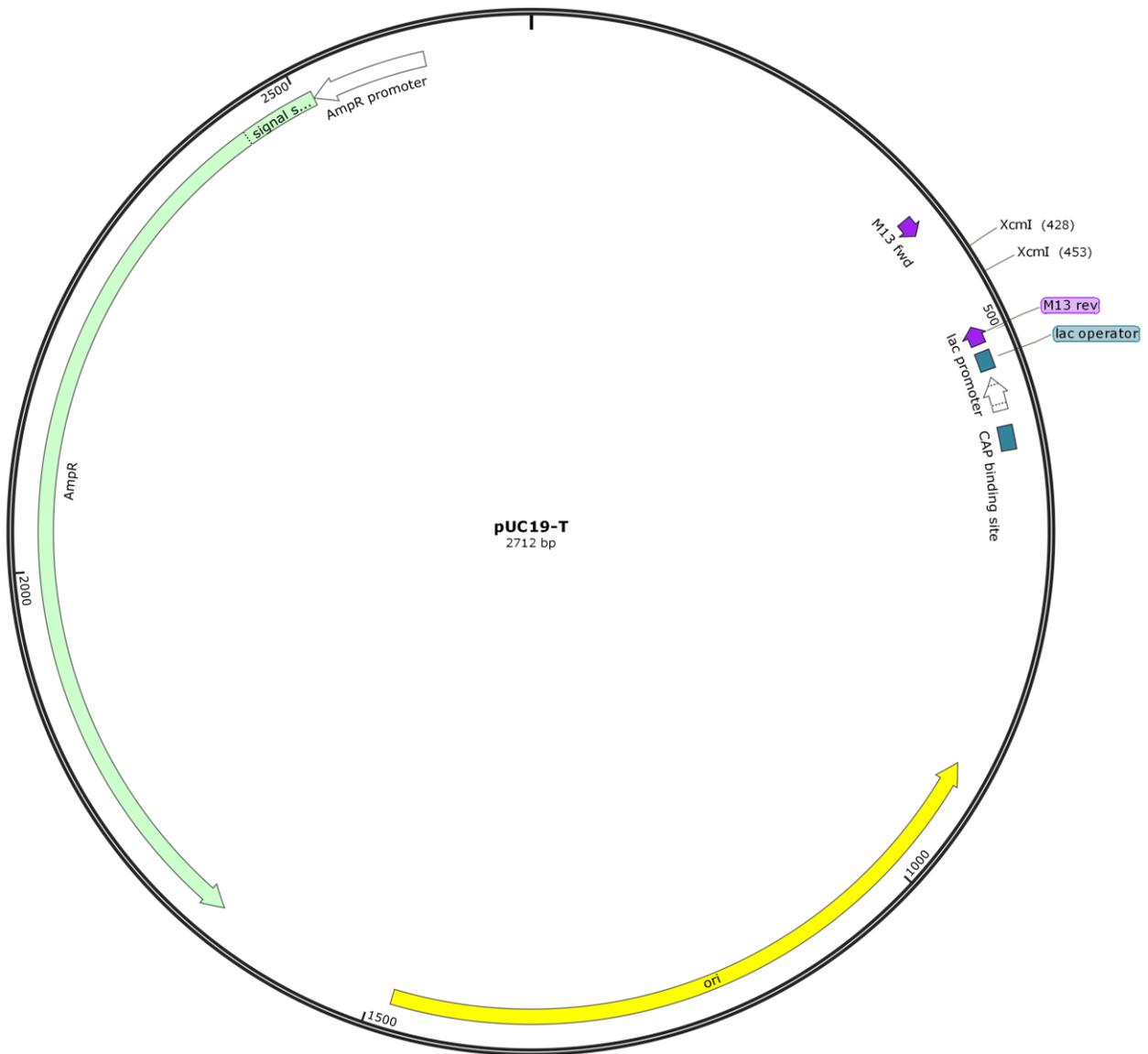


Abbildung 47: Vektorkarte pUC19-T. Die Vektorkarte von pUC19-T wurde in *SnapGene* erstellt und die XcmI-Schnittstellen im Vektor markiert.

11 Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg den 04.11.2015

Florian Mittelberger