

IDA – ein Integrin-spezifisches DNA-Aptamer

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

M. Sc. Katharina Berg

Hamburg, im Februar 2016

Tag der Disputation: 18.03.2016

Gutachter:

Prof. Dr. Ulrich Hahn

Prof. Dr. Chris Meier

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Berg, K., Lange, T., Mittelberger, F., Schumacher, U., Hahn, U., Selection and Characterization of an $\alpha 6\beta 4$ Integrin blocking DNA aptamer, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, in press, (2016).

Berg, K., Magbanua, E. & Hahn, U. SELEX of Cell-Specific RNA Aptamers. *Methods Mol. Biol.* **1380**, 21–32 (2016).

sowie zum Patent angemeldet:

Berg, K., Lange, T., Wicklein, D., Schumacher, U., Hahn, U., Inhibition der Bindung zwischen dem $\alpha 6\beta 4$ Integrin auf Prostatakrebszellen und rekombinantem Laminin-332 durch das $\alpha 6$ Integrin spezifische DNA-Aptamer IDA, Patent: DE 10 2016 100 039.6

In Kooperation entstand folgende Publikation:

Mittelberger, F., Meyer, C., Waetzig, G. H., Zacharias, M., Valentini, E., Svergun, D. I., Berg, K., I. Lorenzen, J. Grötzinger, S. Rose-John, et al., *RNA Biol.*, **12**, 1043–1053 (2015).

Einladung zum Vortrag nach Einreichung eines Posterbeitrages

Berg, K., Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers, *Aptamers*, Oxford (2014).

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	IX
Abstract	XI
1. Einleitung	1
1.1 Integrine.....	1
1.1.1 Laminin-bindende Integrine.....	4
1.1.2 Das $\alpha 6\beta 4$ Integrin.....	5
1.1.3 Das $\alpha 6\beta 4$ Integrin in Verbindung mit Krebserkrankungen.....	7
1.2 Aptamere.....	11
1.2.1 SELEX.....	12
1.2.2 Aptamere und ihre Anwendung.....	16
1.2.3 Modifikation von Aptameren.....	18
2. Zielsetzung	20
3. Material	21
3.1 Chemikalien.....	21
3.2 Puffer und Lösungen.....	21
3.3 Enzyme.....	23
3.4 Proteine und Antikörper.....	23
3.5 Protein- und Nukleinsäure-Standards.....	24
3.6 Nukleotide und Radionukleotide.....	24
3.7 Materialien zur Aptamers Selektion.....	24
3.8 Oligonukleotide.....	25
3.9 Kommerziell erhältliche Kits.....	26
3.10 Medien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten.....	26
3.11 Bakterienstämme und Vektoren.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.12 Zelllinien	27
4. Methoden	28
4.1 Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren	28
4.1.1 Polymerasekettenreaktion	28
4.1.2 Strangtrennung von doppelsträngiger DNA.....	29
4.1.3 Kolonie-PCR	30
4.1.4 <i>In-vitro</i> -T7-Transkription unter Einbau von modifizierten Nukleotiden	30
4.1.5 DNA-Degradation mittels DNase I	31
4.1.6 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren.....	32
4.2 Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren	33
4.2.1 Agarosegelelektrophorese	33
4.2.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese	33
4.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	34
4.2.4 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid	35
4.2.5 Nachweis von Nukleinsäuren mittels UV-Shadowing.....	35
4.2.6 Diffusionselektion von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	35
4.2.7 Isopropanolpräzipitation.....	35
4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
4.3 Methoden zur Proteinanalyse 36	
4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
4.3.2 Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue	37
4.3.3 Kopplung von Proteinen an SIMAG-Carboxylbeads.....	37
4.4 Selektion von Aptameren	38
4.4.1 <i>In vitro</i> Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für das $\alpha 6\beta 4$ Integrin	38
4.5 Klonierungsmethoden	38
4.5.1 Restriktion des Vektors pUC-19	38
4.5.2 Ligation	39
4.5.3 Transformation kompetenter Zellen mittels Elektroporation.....	40

Inhaltsverzeichnis

4.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen.....	40
4.5.5	Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
4.6	Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktion	40
4.6.1	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	40
4.6.2	Filter-Retentions-Assay.....	41
4.6.3	Stabilitätsassay	41
4.6.4	Sekundärstrukturvorhersage selektierter Aptamere	41
4.6.5	Verkürzung von Aptameren anhand vorausgesagter Sekundärstrukturen	41
4.7	Zellbiologische Methoden.....	42
4.7.1	Ablösung adhärenter Zellen	42
4.7.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofectamin	42
4.7.3	Durchflusszytometrie	42
4.7.4	Nachweis von Rezeptoren auf Zelloberflächen mittels Antikörpern	42
4.7.5	Analyse der Bindung von Nukleinsäuren an Zelloberflächen	43
4.7.6	Laser-Scanning Mikroskopie	43
4.7.7	Inhibitionsassay.....	43
5.	Ergebnisse	44
5.1	Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für das $\alpha 6\beta 4$ Integrin.....	44
5.2	Analyse der Bindung der angereicherten Bibliothek an PC-3-Zellen.....	49
5.3	Klonierung und Sequenzierung der Bibliotheken der Runden 10 und 12	52
5.4	Charakterisierung bindender Nukleinsäuren.....	54
5.4.1	Analyse zur Identifizierung bindender Nukleinsäuren	54
5.4.2	Verdrängung des $\beta 4$ Integrin Antikörpers durch Nukleinsäuren	55
5.4.3	Inhibition der Bindung von PC-3-Zellen an Laminin-332.....	56
5.5	Weitere Charakterisierung von IDA	58
5.5.1	Bestimmung der Affinität von IDA an PC-3-Zellen	58
5.5.2	Bestimmung der Spezifität von IDA	59
5.5.3	Internalisierung von IDA in PC-3-Zellen.....	63

Inhaltsverzeichnis

5.5.4	Analyse der Stabilität von IDA in Medium und Blutplasma.....	68
5.5.5	CD-Spektroskopische Analyse der Struktur von IDA.....	69
5.5.6	Vergleich der Bindungsstellen von IDA und nc1236.....	70
5.6	Verkürzung von IDA anhand von Sekundärstrukturanalysen	72
5.6.1	Bindungs- und Inhibitionsanalysen von IDA-A und IDA-B.....	74
5.6.2	Strukturelle Untersuchung der verkürzten Varianten von IDA.....	75
5.7	Postselektive Modifikation von IDA	76
5.7.1	Thio-Modifikation	76
5.7.2	PEGylieren von IDA.....	77
5.8	Aptamer-vermitteltes Einschleusen von miRNA	79
6.	Diskussion	81
6.1	Selektion von Aptameren mit Affinität für das $\alpha 6\beta 4$ Integrin.....	82
6.2	Charakterisierung bindender Nukleinsäuren.....	85
6.3	Weitere Charakterisierung von $\alpha 6\beta 4$ Integrin spezifischen Aptameren.....	87
6.4	Postselektive Modifikation von IDA	92
6.5	Aptamer-vermitteltes Einschleusen von miRNA.....	94
7.	Ausblick	97
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Eidesstattliche Erklärung	109
10.	Danksagung	110
11.	Anhang	111
11.1	Sequenzen	111
11.2	Gefahrstoffe.....	112
11.3	KMR-Stoffe.....	115
11.4	Lebenslauf.....	116

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BP	<i>Bullous pemphigoid</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
Fc	<i>Crystallisable fragment</i>
FKS	Fötales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FNIII	Fibronectin III
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HAc	Essigsäure
HER3	<i>Human epidermal growth factor receptor-3</i>
IC ₅₀ -Wert	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IgG	Immunglobulin G
JAK	Janus-Kinase
<i>K_d</i>	Dissoziationskonstante
<i>K_i</i>	Inhibitionskonstante
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>
M	Molar
M	Molare Masse
Mek	<i>Mitogen-activated/extracellular regulated protein kinase</i>
mRNA	<i>MessengerRNA</i>
miRNA	MikroRNA
MUC1	Mucin1
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTPs	Nukleosid-5'-triphosphate
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
P	Phosphat

Abkürzungsverzeichnis

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositid-3-OH-Kinase
PNK	Polynukleotidkinase
PSMA	Prostata-spezifisches Membran-Antigen
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
Shc	<i>(Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SPC	<i>Surfactant protein</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
ssDNA	Einzelsträngige DNA
STAT3	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription 3

Abkürzungsverzeichnis

T	Thymin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
UV	Ultraviolett
VCAM-1	vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumenanteil (<i>volume per volume</i>)
w/v	Massenanteil (<i>weight per volume</i>)
XNA	Xeno-Nukleinsäuren

Zusammenfassung

Das heterodimere $\alpha 6\beta 4$ Integrin ist ein großes Zelloberflächenprotein, das durch Bindung an Laminin-332 die Bildung von Hemidesmosomen einleitet und somit zu einer festen Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix führt. Zudem spielt es durch seine signalgebenden intrazellulären Domänen eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen z.B. während der Wundheilung. Krebszellen, die das $\alpha 6\beta 4$ Integrin ebenfalls präsentieren, nutzen diese durch Laminin-Bindung entstehenden Signalwege zur Förderung des Tumorzellwachstums und zur organotropen Metastasierung. Eine höhere Präsentation des Integrins auf Krebszellen führt so oft zu einer schlechteren Prognose von Tumorpatienten.

Da somit die Blockierung der Integrin-Laminin-Interaktion von hohem therapeutischem Interesse ist, war das Ziel dieser Arbeit die Selektion $\alpha 6\beta 4$ Integrin inhibierender Aptamere. Zunächst erfolgten zur Anreicherung von Nukleinsäuren für die native Konformation des Integrins fünf Zell-SELEX-Runden mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin präsentierenden Prostatakrebszellen (PC-3). Anschließend wurde zur Erhöhung der Spezifität der resultierenden Bibliothek eine konventionelle SELEX mit dem rekombinanten Integrin durchgeführt. Nach zwölf Selektionsrunden konnte eine gesteigerte Bindung der Bibliothek an PC-3-Zellen beobachtet werden und die anschließende Klonierung und Sequenzierung führte zu 20 Klonen, die allerdings keine Sequenzähnlichkeiten aufwiesen. Deshalb wurden alle erhaltenen Nukleinsäuren auf ihre Bindung an die PC-3-Zellen überprüft. Dabei zeigte die Nukleinsäure nc1228 die höchste Affinität zu den Zellen mit einer Dissoziationskonstante von 137 ± 22 nM. Diese Nukleinsäure wurde dann im Folgenden Integrin $\alpha 6\beta 4$ spezifisches DNA Aptamer (IDA) genannt. Folgende Inhibitionsstudien zeigten dann, dass IDA die Bindung von PC-3-Zellen an Lamin-332 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Wert) von ~ 150 nM inhibierte. Die weitere Analyse zeigte zudem, dass IDA sowohl spezifisch an das humane als auch an das murine $\alpha 6$ Integrin gebunden hat. Zudem konnte mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie gezeigt werden, dass das Aptamer in die Zellen internalisiert wird. Die Halbwertszeit von IDA lag in murinem Plasma bei sechs Stunden. Deshalb erfolgte zur Verbesserung der Stabilität und Pharmakokinetik von IDA dessen Modifikation. Dabei führte der intramolekulare Einbau von Thionukleotiden zu einem Verlust der Bindung, während bei der 3'-PEG-Modifikation die Bindung erhalten blieb. Die Analyse der Struktur ergab für IDA Stamm-Schleifen in B-DNA-Form, welche auch in Sekundärstrukturanalysen erkennbar waren. Davon ausgehend wurden zwei mögliche Verkürzungen ermittelt. Diese IDA-A und IDA-B (44 bzw. 36 nt) genannten Nukleinsäuren, waren zwar in der Lage, an die

Zusammenfassung

PC-3-Zellen zu binden, allerdings konnten sie die Integrin-Laminin-Interaktion nicht inhibieren.

Abstract

The heterodimeric laminin receptor $\alpha 6\beta 4$ integrin plays a central role in the promotion of tumor cell growth, invasion, and organotropic metastasis. As an overproduction of the integrin is often linked to a poor prognosis, the inhibition of $\alpha 6\beta 4$ integrin binding to laminin is of high therapeutical interest. Therefore the aim of this study was the selection of $\alpha 6\beta 4$ integrin inhibiting aptamers. To select a DNA aptamer specific for $\alpha 6\beta 4$ integrin in its native state, a cell-SELEX approach was started using prostate cancer cells (PC-3). After five rounds of enrichment, a conventional SELEX approach was done by using the recombinant protein immobilized on magnetic beads. After 12 selection rounds, the enriched library showed an increased affinity towards PC-3 cells compared to the starting library. As this library showed an enrichment of binding species for ITGB4 knockdown cells as well, two libraries, the one from round 12 as well as from round 10, were cloned and sequenced. The results of the sequencing showed no enrichment of distinct species. Therefore all obtained nucleic acids were analyzed for their binding capacity. The highest affinity showed nc1228, which had a dissociation constant of 137 ± 22 nM. This nucleic acid was further termed **Integrin $\alpha 6\beta 4$ specific DNA Aptamer (IDA)**. The aptamer was further able to block the integrin-laminin-interaction with an apparent K_i of 123 ± 44 nM. The IC_{50} -value was calculated to be around 150 nM. Instead of a complete loss of binding to ITGB4 knockdown cells, IDA showed a reduced binding. Therefore the specificity of IDA was determined by electrophoretic mobility shift assay using the human recombinant proteins $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$. IDA bound to both $\alpha 6$ Integrin, but not to $\alpha 4\beta 1$. Furthermore IDA was able to bind the murine $\alpha 6\beta 4$ and to be internalized into PC-3 cells as well. Cd-Spectroscopic analysis identified the structure of IDA as a B-DNA stem loop, whose formation is independent of different salt conditions. Via secondary structure predication it was possible, to identify 3 possible stem loops. These data was used for the truncation of IDA, whereas both constructs were able to bind PC-3 cells, but did not block the integrin-laminin-interaction.

The half-life time of IDA in murine plasma was determined to be around 6 h. Therefore to increase the stability and pharmacokinetic modifications of IDA were produced. An intramolecular thiomodification led to a loss of binding, whereas a 3' pegylation retained its ability to bind to PC-3 cells.

1. Einleitung

1.1 Integrine

Integrine sind heterodimere Typ-I-Transmembran-Glycoproteinrezeptoren, aufgebaut aus einer nicht-kovalent verknüpften α und einer β Untereinheit.^{1,2} Sie kommen in einer ganzen Reihe von Organismen vor.¹ Diese reichen von Schwämmen, Korallen und Nematoden bis hin zu Säugetieren.^{1,3} Integrine vermitteln die stabile Adhäsion von Zellen an deren extrazelluläre Umgebung und verknüpfen somit die intra- und extrazelluläre Umgebung miteinander.² Sie reagieren außerdem sowohl auf intra- als auch auf extrazelluläre Stimuli und leiten bidirektional Signale weiter.⁴ Dabei aktivieren sie eine ganze Reihe von intrazellulären Signalwegen, deren Antworten weitreichende Folgen für die Proliferation, funktionelle Differenzierung, Polarität, das Überleben und die Migration von Zellen haben.^{2,5} Als Regulatoren der Zellmigration und des extrazellulären Matrixaufbaus spielen sie eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und bei Immunantworten.⁴

In Säugetieren gibt es jeweils acht verschiedene β - und 18 α -Untereinheiten, die sich zu 24 verschiedenen Integrinen kombinieren.² Jedes Heterodimer besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne, die für die Signalweiterleitung zuständig ist.^{1,2}

Die Struktur der extrazellulären Domäne wurde erstmals 2001 durch Xiong *et al.* gelöst.⁶ Die erhaltene Kristallstruktur des $\alpha 6\beta V$ Integrins zeigte das Integrin in einer gebeugten Form. Diese gilt als inaktiv, da die Ligandenbindungsstelle in der Nähe der Membran liegt. Elektronenmikroskopieaufnahmen zeigten, dass bei Ligandbindung eine aufrechte Struktur und somit aktive Form entsteht.⁷ Die nachfolgende Abbildung zeigt beide Formen der extrazellulären Domänen.

Einleitung

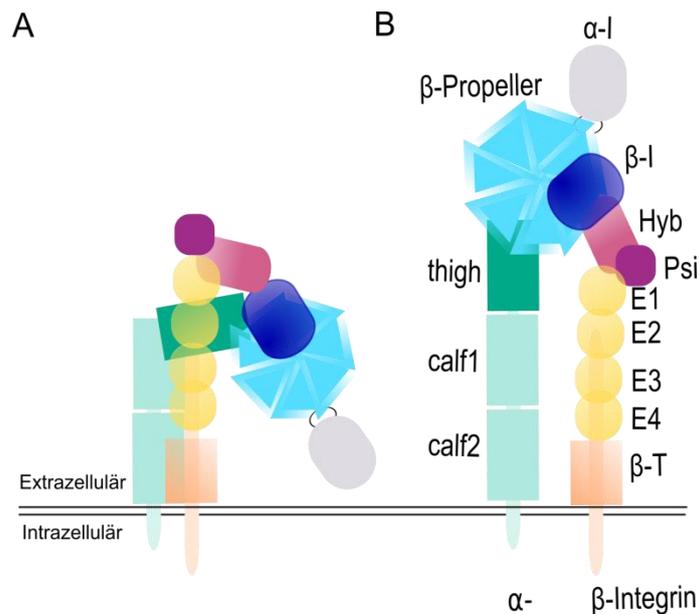


Abbildung 1: Darstellung der Domänen der α - und β -Integrine in ihrer gebeugten (A) und gestreckten Form (B). Das α -Integrin besteht aus vier bzw. fünf extrazellulären Domänen (links), während das β -Integrin (rechts) acht aufweist. In der gebeugten Form liegen die Substratbindestellen des β -Propellers (hellblau) sowie der β -I-Domäne (dunkelblau) in der Nähe der Membran (Doppellinie). Diese Form ist inaktiv. In der aktiven, gestreckten Form sind die Bindestellen leicht zugänglich (modifiziert nach Campbell und Humphries⁷).

Der extrazelluläre Teil des α -Integrins besteht aus vier bzw. fünf Domänen. Der β -Propeller (Abb.1, hellblau) ist an der Ligandenbindung beteiligt und besitzt Ca^{2+} Bindungstellen.⁸ Zusätzlich besitzen neun der 18 α -Integrine noch eine α -I-Domäne, welche aus fünf β -Faltblättern umgeben von sieben α -Helices besteht (grau).⁷ Neben dem Propeller besitzt das α -Integrin extrazellulär noch eine *thigh*- und zwei *calf*-Domänen, welche eine Immunglobulin-ähnliche Sandwichfaltung einnehmen (grün).

Der extrazelluläre Teil des β -Integrins besteht aus acht Domänen mit insgesamt ~ 640 Aminosäuren. Die β 1-Domäne (dunkelblau) ist homolog zur α -I-Domäne und in die Hybriddomäne (Magenta) eingeschoben, welche eine β -Sandwichfaltung einnimmt. Es folgen eine Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne (PSI, violett) sowie vier Cystein-reiche *epidermal growth factor* (EGF)-Domänen (gelb). Die letzte Domäne ist die β -T-Domäne, die aus vier β -Faltblättern besteht.^{6,7}

Beide Teile des Integrin-Dimers besitzen nur kleine intrazelluläre Domänen.⁷ Einzige Ausnahme bildet das β 4 Integrin, auf das in Kapitel 1.1.2 näher eingegangen wird.

Insgesamt werden die Integrine über ihre Bindungspartner in verschiedene Klassen eingeteilt. Es gibt Integrine, die extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Collagen oder Laminin binden.^{1,2,9} Andere Integrine binden zelluläre Rezeptoren, wie das vaskuläre

1.1.1 Laminin-bindende Integrine

Laminine sind große Zelladhäsionsproteine in der epithelialen Basalmembran. Durch ihre Interaktion mit den Integrinen ($\alpha7\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$) an der Zelloberfläche regulieren sie die Adhäsion der Zellen sowie zelluläre Funktionen wie die Proliferation, die Polarität und die Differenzierung von Zellen.¹²

Laminine sind Heterotrimere bestehend aus je einer α -, β - und γ -Untereinheiten.¹³ Es gibt fünf verschiedene α -, drei β - und drei γ -Untereinheiten, woraus insgesamt 16 verschiedene Laminine resultieren. Abbildung 3 zeigt exemplarisch den Aufbau des Laminins-332. Dieses besteht, wie der Name schon andeutet aus den $\alpha3$ -, $\beta3$ - und $\gamma2$ -Untereinheiten.^{13,14}

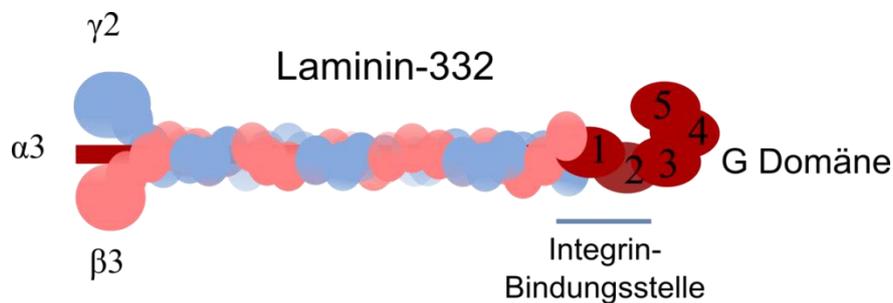


Abbildung 3: Aufbau des Laminins-332. Es besteht aus drei Untereinheiten $\alpha3$, $\beta3$ und $\gamma2$, die sich umeinander winden. Die G-Domäne in der $\alpha3$ -Untereinheit ist für die Bindung der Integrine verantwortlich (modifiziert nach Marinkovich *et al.*).^{13,14}

Die Integrin-Bindestelle am Laminin-332 befindet sich in der großen G-Domäne in den ersten drei Wiederholungen (1-3). Die Interaktion mit Proteinen der Basalmembran erfolgt über die kleinen Seitenketten der $\beta3$ - und $\gamma2$ -Untereinheit.^{13,14}

Die Spezifität der Laminin-Integrin-Interaktion wird durch die α -Untereinheit des Laminins bestimmt. Dabei bindet das $\alpha7\beta1$ Integrin an alle α -Laminine bis auf das $\alpha3$, während das $\alpha3\beta1$ Integrin nur mit $\alpha3$ - und $\alpha5$ -Lamininen interagiert. Das $\alpha6\beta1$ Integrin bindet alle fünf α -Untereinheiten, allerdings affiner an $\alpha1$ -, $\alpha3$ - und $\alpha4$ -Laminine. Das $\alpha6\beta4$ Integrin, das die gleiche α -Einheit besitzt, zeigt dagegen eine höhere Spezifität. Es bindet sehr affin an das Laminin-332 und in geringem Maße an $\alpha5$ -Laminine.¹⁵ Auf dieses Integrin und dessen Funktion wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.1.2 Das $\alpha 6\beta 4$ Integrin

Das $\alpha 6\beta 4$ Integrin wird auf einer Vielzahl von Epithel-, Schwann- und Endothelzellen präsentiert.¹⁶ Dabei besitzt das Integrin zwei verschiedene Funktionen. Zum einen sorgt es durch die Bildung von Hemidesmosomen für eine feste Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und zum anderen spielt es durch seine signalgebenden intrazellulären Domänen eine wichtige Rolle in der Migration von Zellen z.B. während der Wundheilung.¹⁷

Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau sowie die Bindungs- und Phosphorylierungsstellen der intrazellulären Domänen des $\beta 4$ Integrins.

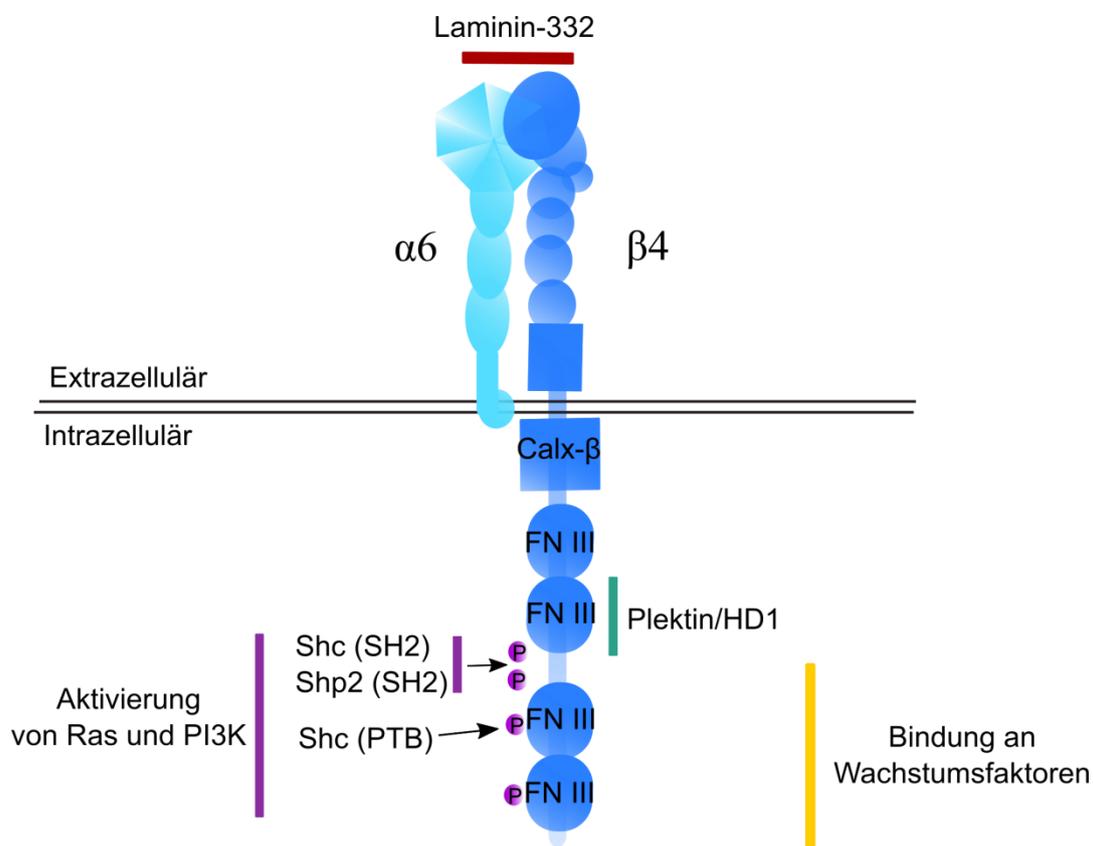


Abbildung 4: Die Integrinstruktur unter Berücksichtigung der Bindungs- sowie Phosphorylierungsstellen. Das Integrin bindet extrazellulär Laminin-332 (rot). Intrazellulär erfolgt die Bindung an Plektin über die zweite Fibronectin III-Domäne (grün) sowie von Wachstumsfaktoren (gelb) über die letzten beiden Domänen. Zudem weist das Integrin noch mehrere Phosphorylierungsstellen auf, die zur Aktivierung von Ras und der PI3K führen (violett; modifiziert nach Stewart und O'Connor sowie Winograd-Katz *et al.*^{16,18}).

Der intrazelluläre, signalgebende Teil des $\beta 4$ Integrins mit über 1000 Aminosäuren ist einzigartig unter den Integrinen. Er besteht aus einer membranproximalen $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschdomäne (Calx- β) sowie zwei Paaren Fibronectin III-(FN III)-Domänen, getrennt durch ein verbindendes Segment.¹⁹ Zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden besitzt das

Einleitung

Integrin Phosphorylierungsstellen (Abb. 4, violett), an die nach Phosphorylierung z.B. das Signal-Adapter-Protein Shc binden und die Ras-ERK-Signalkaskade auslösen kann.¹⁷ Die zweite FN-III-Domäne besitzt eine Plektinbindungsstelle (grün), während der Wachstumsfaktor ErbB2 mit den zwei letzten FN III-Domänen interagieren kann (gelb).¹⁹

$\alpha 6 \beta 4$ Integrin zusammen mit seinem Bindungspartner, dem Laminin-332, ermöglicht die Bildung großer Adhäsionskomplexe, genannt Hemidesmosomen. Dabei verbindet es intrazelluläre Cytokeratin-Intermediatfilamente mit den Lamininen der extrazellulären Matrix durch Interaktion mit Plektin, dem *bullous pemphigoid* (BP) Antigen 180 (Collagen XVII) sowie BP230 und Tetraspanin (CD151; Abbildung 5).^{16,20–22}

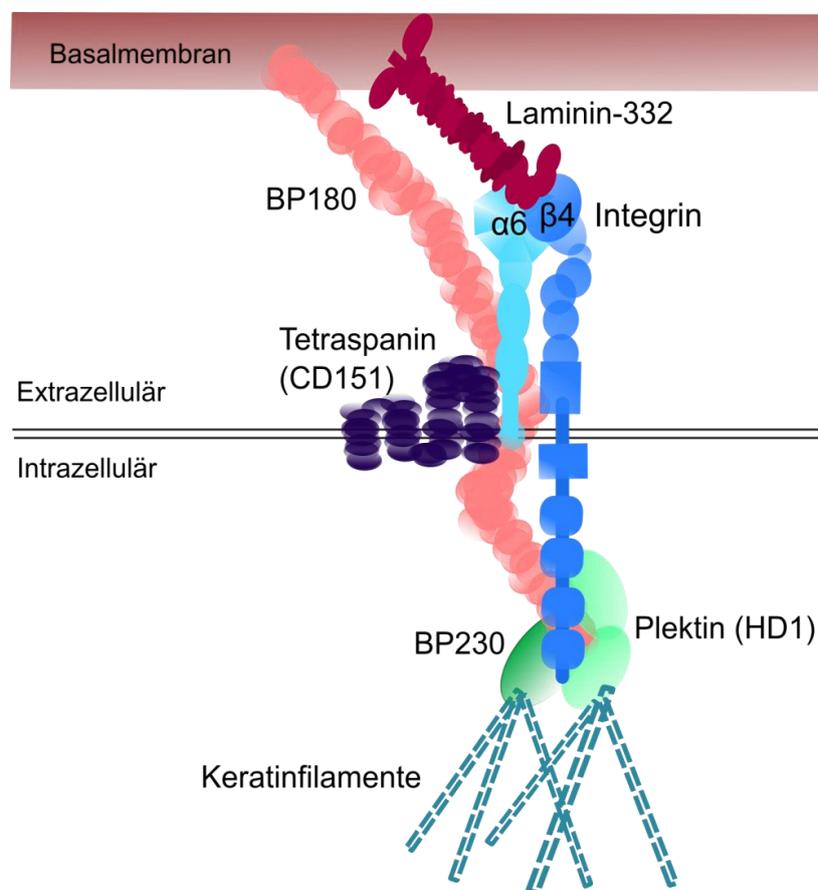


Abbildung 5: An der Hemidesmosomenbildung beteiligte Proteine. An Integrin bindet zunächst das Laminin und dann intrazellulär Plektin. Es folgt die Rekrutierung von BP230 und BP180 sowie Tetraspanin. Dieser Komplex verknüpft somit die Basalmembran mit den intrazellulären Keratinfilamenten (modifiziert nach Stewart und O'Connor¹⁶ sowie Margadant *et al.*¹⁹)

Nach Laminin-Integrinbindung erfolgt der kritische Schritt der Hemidesmosomenbildung durch Bindung des Plektins (Abb.5, hellgrün) an das erste Paar der FN-III-Wiederholung sowie an die 35 N-terminalen Aminosäuren des verbindenden Segmentes. Anschließend interagiert das BP180 (rosa) mit dem Laminin-332 sowie intrazellulär mit dem Plektin und

Einleitung

der dritten FNIII-Wiederholung des $\beta 4$ Integrins. Zusätzlich zur Bindung an $\beta 4$, bindet das BP180 auch noch den extrazellulären Teil des $\alpha 6$ Integrins sowie Tetraspanin (violett), das ebenfalls an $\alpha 6$ Integrin bindet. Letztendlich werden noch das BP230 (dunkelgrün) sowie die Keratinfilamente rekrutiert.¹⁹

Neben diesen Typ I-Hemidesmosomen gibt es auch noch eine weitere Form, die nur aus Plektin, Integrin und Laminin besteht (Typ II) und vorwiegend im einfachen Epithelium z.B. bei Intestinen vorkommt.¹⁹

$\beta 4$ -Integrin-*Knockout*-Mäuse belegen die Bedeutung des $\beta 4$ Integrins für den Erhalt der Integrität von Zell-Matrixkontakten. Aufgrund des Verlustes der Hemidesmosomen wurden die Mäuse mit schwerwiegenden epidermalen Bläschen geboren, da weitreichend die epithelialen-mesenchymalen Verbindungen getrennt waren. Dadurch starben die Mäuse kurz nach ihrer Geburt.^{16,23} Zellen, die nicht an die extrazelluläre Matrix adhäreren, gehen zudem in eine spezielle Form der Apoptose, Anoikis genannt, über. Dabei erfolgt die Spaltung des $\beta 4$ Integrins durch Caspasen.^{16,23}

Insgesamt handelt es sich bei Hemidesmosomen um dynamische Strukturen. Damit während der Wundheilung die Zellen in die Wunde migrieren können, erfolgt die Auflösung der Hemidesmosomen durch Phosphorylierung des cytoplasmatischen Teils des $\beta 4$ Integrins. Daraus resultiert eine Re-Lokalisation des Integrins vom Keratin zum Actincytoskelett, wobei eine Reihe von Signalkaskaden ausgelöst wird. Diese Kaskaden fördern durch Kooperation mit Wachstumsfaktoren die Bildung von Strukturen, wie Filopodia und Lamellen, und somit die Migration der Zellen und das Schließen der Wunde. Dieser Prozess wird entweder durch Stimulation mit Wachstumsrezeptoren, wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR), oder mittels direkter Phosphorylierung von Tyrosinresten im verbindenden Segment des Integrins durch die Proteinkinase C eingeleitet.^{17,19}

1.1.3 Das $\alpha 6\beta 4$ Integrin in Verbindung mit Krebserkrankungen

In normalen Zellen erfolgt durch die Bindung des $\alpha 6\beta 4$ Integrins an Laminin-332 eine Bildung stabiler, adhäsiver Strukturen, genannt Hemidesmosomen (Abbildung 6, links). Bei Tumorzellen dagegen werden die Hemidesmosomen aufgelöst und wie bei der Wundheilung erfolgt eine Re-Lokalisation des Integrins an die Aktinfilamente (Abbildung 6, rechts).⁵

Einleitung

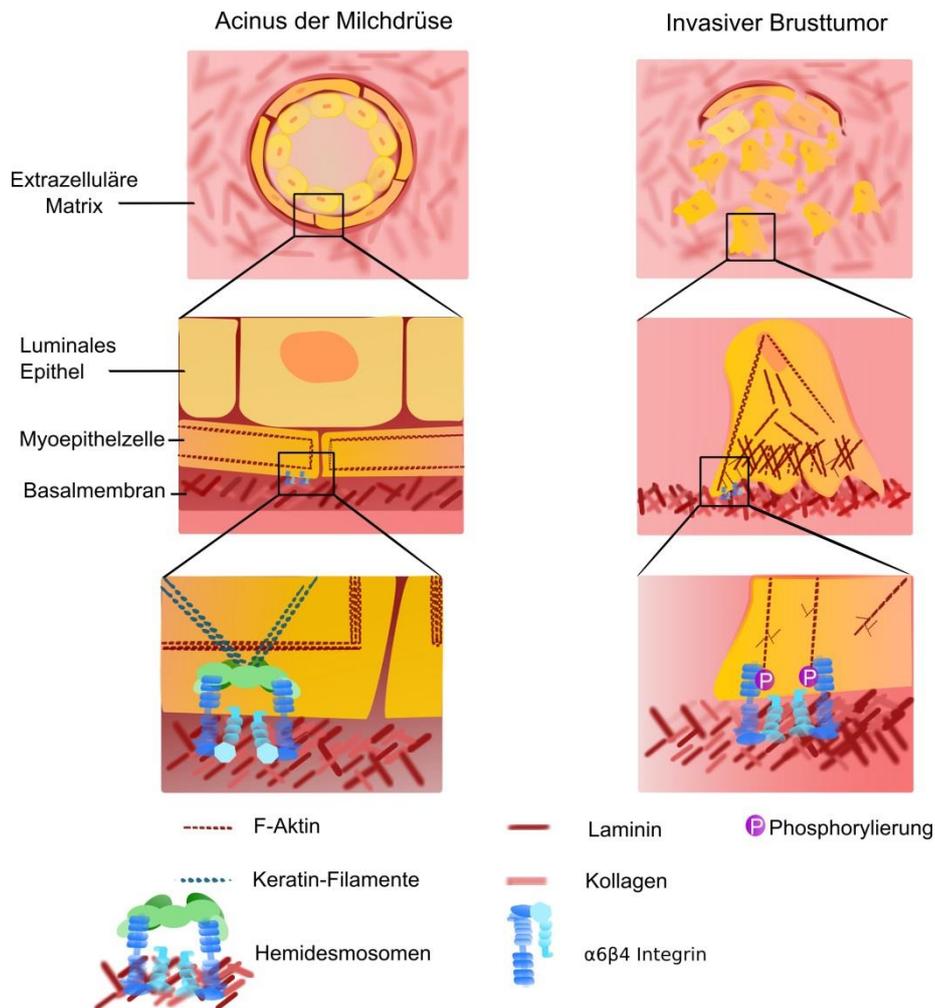


Abbildung 6: Das $\alpha 6 \beta 4$ Integrin in normalem Brustgewebe und in einem invasiven Brusttumor. Links: Die normalen Acini der Milchdrüse besitzen eine polarisierte Struktur mit einem luminalen Epithelium und einer myoepithelialen Schicht umgeben von der Basalmembran. In den Myoepithelialzellen verbindet das $\alpha 6 \beta 4$ Integrin die Keratinfilamente mit der Basalmembran durch Ausbildung von Hemidesmosomen. Rechts: Invasive Brusttumore verlieren ihre organisierte Struktur, Polarität und Form durch eine höhere Regulation von Matrix-Metalloproteasen. Dabei relokalisiert das phosphorylierte $\alpha 6 \beta 4$ Integrin nach Auflösung der Hemidesmosomen zu den Aktinfilamenten. Diese Filamente bilden dann Ausstülpungen und vermitteln Zellmigration und Invasion (modifiziert nach Nisticò *et al.* ⁵).

Nach Integrin-Re-Lokalisation entstehen bewegliche Strukturen wie Filopodia und Lamellen,²⁴ und es werden Signalkaskaden aktiviert, die das Tumorwachstum, die Invasion und die Metastasierung weiter fördern.^{25–27}

Durch die Bindung des Laminins an das Integrin außerhalb von Hemidesmosomen erfolgt die Aktivierung der Phosphoinositid-3-OH-Kinase (PI3K) und von RhoA *small* GTPasen (Abb.7, rosa und gelb).^{28,29} Zusätzlich wird durch Kooperation mit verschiedensten Wachstumsfaktoren deren Aktivierung verstärkt sowie der Ras/Erk-Signalweg ausgelöst (Abb. 7, violett).^{30–32} Bei Zellen, die eine Mutation im Tumorsuppressor-Gen p53 aufweisen, fördert der AKT-Signalweg dann das Überleben der Zelle sowie das Ras-Mek-Erk-Signal die

Einleitung

Progression des Zellzyklus und die Proliferation der Tumorzellen (Abb.7, grün).^{33,34} Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Integrin in Brust- und Pankreaskrebs zu einer Erhöhung der Expression invasiver und metastasenfördernder Proteine, wie z.B. Metastasin (S100A4), führt (Abb. 7, orange).^{16,35} Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die eingeleiteten Signalkaskaden.

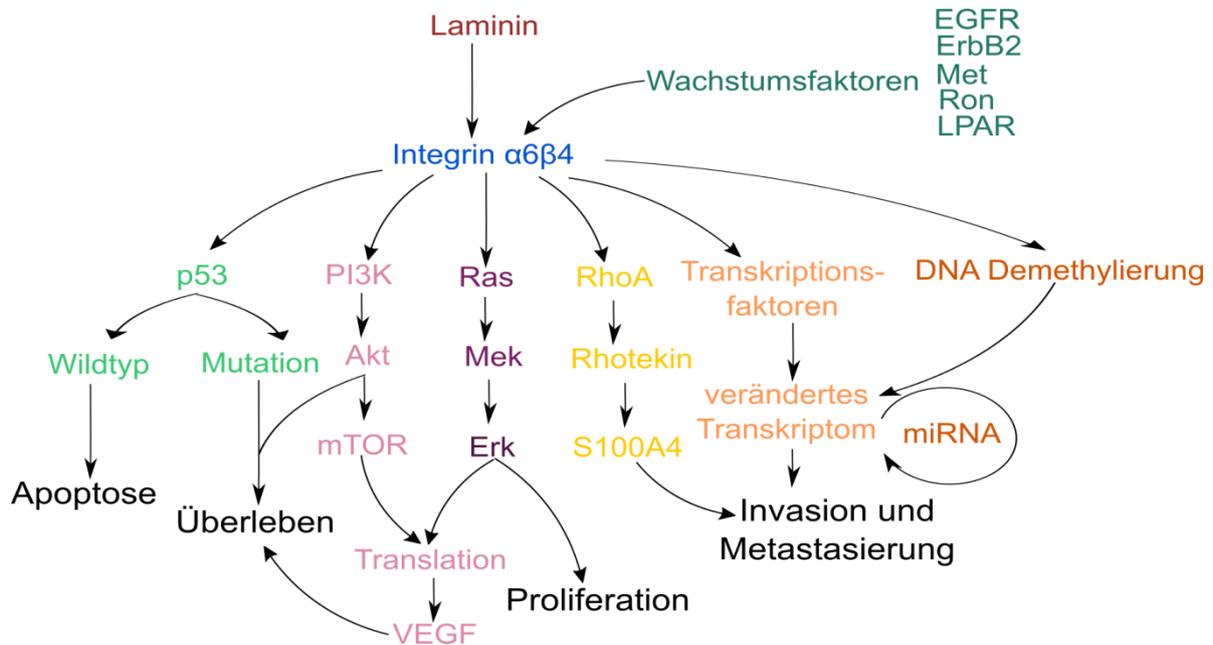


Abbildung 7: Nach Laminin-Integrin-Interaktion oder Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren können zahlreiche Signalwege eingeleitet werden. So führt der Ras-Mek-Erk-Signalweg (violett) ebenso zu einer Proliferation der Krebszellen wie die Aktivierung der PI3K (rosa). RhoA GTPasen bewirken die Produktion von Proteinen, wie S100A4, die die Metastasierung und Invasion auslösen, ebenso wie Integrin-assoziierte Transkriptionsfaktoren, die neben der DNA-Demethylierung für ein verändertes Transkriptom sorgen. Auch ein verändertes Level verschiedener miRNAs konnte beobachtet werden. Zusätzlich dazu weisen Zellen durch das Zusammenspiel einer Mutation des p53 und des Akt-Signalweges eine höhere Überlebensrate auf (modifiziert nach Stewart *et al.*).¹⁶

Integrin wird in Tumoren der Lunge, der Brust der Schilddrüse, beim Pankreas Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom überproduziert. Aufgrund der oben erwähnten Signalkaskaden und der daraus resultierenden Förderung der Proliferation, des Überlebens, sowie der Invasion und Metastasierung von Tumoren korreliert eine Überproduktion des Integrins häufig mit einer schlechten Prognose des Patienten. Zudem ist während der Tumorprogression eine veränderte Lokalisation des Integrins in Tumoren der Brust, des Pankreas, der Blase und des Gebärmutterhalses zu beobachten.^{5,16,36-38} Sowohl die Überproduktion als auch die Re-Lokalisation spielen somit eine wichtige Rolle bei der Metastasierung der Krebszellen.

Einleitung

Hoshino *et al.*³⁹ konnten zudem zeigen, dass $\alpha 6\beta 4$ / $\alpha 6\beta 1$ Integrin-präsentierende Exosomen eine gerichtete Metastasierung des Primärtumors in die Lunge vorbereiten. Abbildung 8 zeigt dies schematisch.

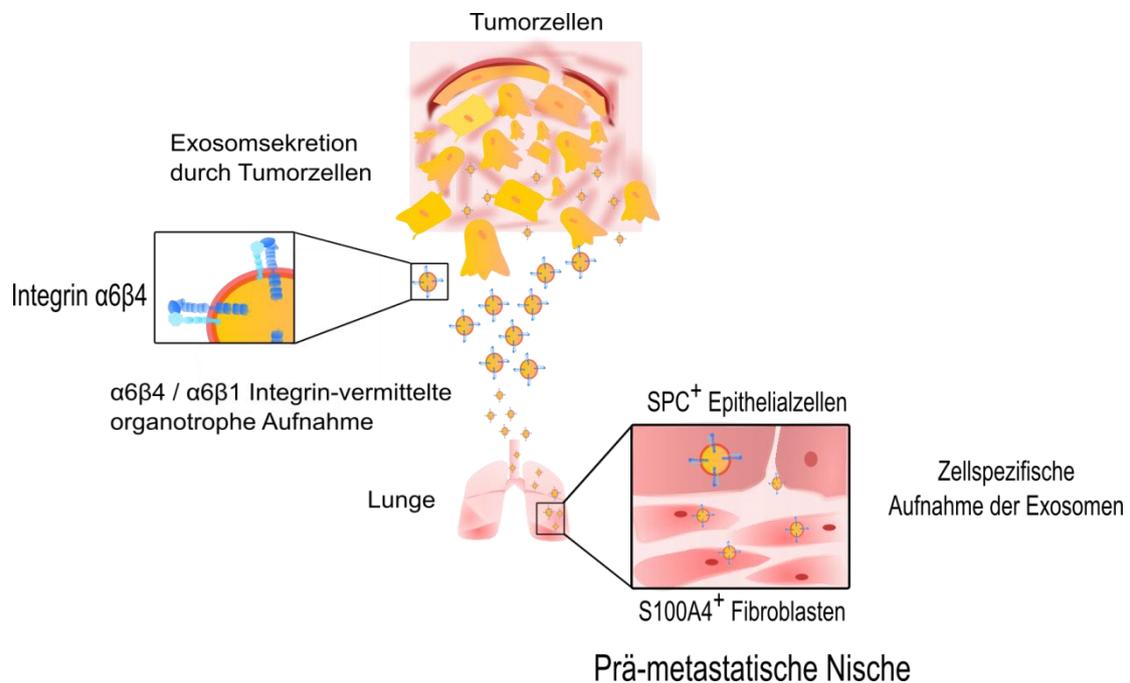


Abbildung 8: Die vom Primärtumor gebildeten Exosomen wandern Integrin-vermittelt in die Lunge und werden dort zellspezifisch aufgenommen. Dies führt zu einer veränderten Proteinexpression und zur Ausbildung einer pre-metastatischen Nische (modifiziert nach Hoshino *et al.*³⁹).

Die vom Primärtumor gebildeten Exosomen werden durch das $\alpha 6\beta 4$ Integrin organotrophisch in die Lunge aufgenommen. Dabei verschmelzen sie mit S100A4-positiven Fibroblasten sowie den *surfactant protein* (SPC)-positiven Zellen in Laminin-reicher Umgebung und bilden eine Prä-metastatische Nische. Das bedeutet, dass durch die höhere Expression verschiedener Proteine eine Mikroumgebung geschaffen wird, die das Tumorwachstum nach dessen Ankunft fördert.³⁹

1.2 Aptamere

Aptamere sind kurze DNA- oder RNA-Moleküle (18-100 nt), die aufgrund ihrer sequenzabhängigen dreidimensionalen Faltung spezifisch und mit hoher Affinität an ihre Zielmoleküle binden können. Beschrieben wurden sie erstmals 1990 von drei verschiedenen Gruppen. Als erstes berichteten Robertson und Joyce im März von der Selektion eines RNA-Enzymes, das spezifisch einzelsträngige DNA schneidet.⁴⁰ Im August nannten dann Tuerk und Gold ihre Selektionsmethode “Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX)“. Diese nutzen sie zur Identifizierung von RNAs, die an die Bakteriophage-T4-DNA-Polymerase binden konnten.⁴¹ Ende August prägten dann Ellington und Szostak durch die Selektion von farbstoffbindender RNA, das Wort Aptamere, das vom lateinischen „aptus“ und vom griechischen „meros“ stammt und in Kombination „passendes Teil“ bedeutet.⁴²

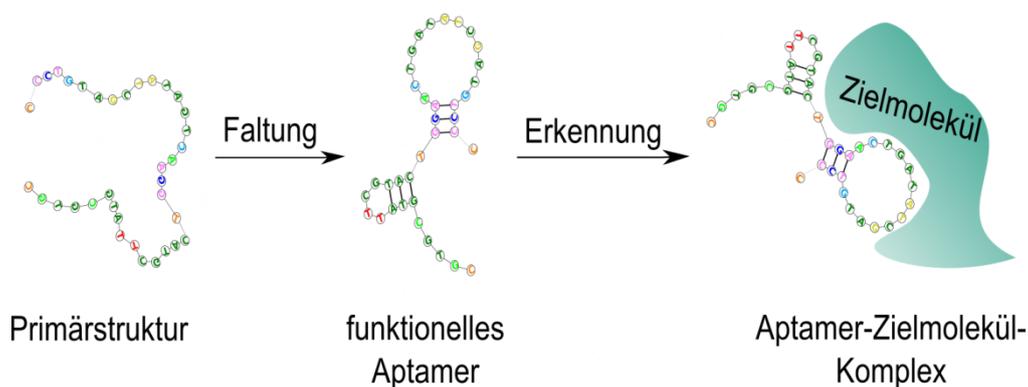


Abbildung 9: Aptamere binden aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung an ihre Zielmoleküle. (modifiziert nach Sun *et al.*⁴³)

Bis heute wurden über 900 verschiedene Aptamere mittels SELEX generiert; dabei reichen die Zielmoleküle von kleinen organischen Molekülen und Schwermetallen-Ionen über Peptide, Proteine und Nanomaterialien zu Bakterien sowie eukaryotischen Zellen.^{42,44–48} Die Dissoziationskonstanten der Aptamer-Zielmolekülkomplexe können ähnlich wie bei Antikörpern (AK) im picomolaren Bereich liegen.⁴³ Dabei haben Aptamere gegenüber AK zahlreiche Vorteile. Sie lassen sich durch chemische Synthese im großen Maßstab ohne Variationen zwischen einzelnen Chargen herstellen. Ihre Herstellungskosten sind gering und sie sind leichter zu modifizieren. Außerdem sind sie thermisch stabil und besitzen aufgrund ihrer kleineren Größe eine höhere Bioverfügbarkeit.⁴³ So zeigten Xiang *et al.*, dass das EpCAM Aptamer effektiv in Tumore eindringen konnte und dort eine vierfach höhere Verweildauer besaß als der entsprechende Antikörper.⁴⁹ Zudem sind Aptamere in den meisten

Fällen nicht-immunogen und nicht-toxisch, im Gegensatz zu Antikörpern, deren Fc-Region zu unvorhersehbaren Immunreaktionen führen kann.⁴³

1.2.1 SELEX

Aptamere werden durch den SELEX-Prozess generiert, bei dem sich in einem wiederholenden Kreisprozess bindende Nucleinsäuren anreichern. Es wird von einer Nucleinsäurebibliothek mit bis zu $\sim 10^{15}$ verschiedenen Molekülen ausgegangen, deren Vielfalt durch einen randomisierten Bereich entsteht. Dieser wird zur Amplifikation von zwei Primerregionen flankiert. Vereinfacht dargestellt beginnt die SELEX mit der Inkubation der Nucleinsäurebibliothek und dem Zielmolekül. Die bindenden und nicht-bindenden Spezies werden voneinander getrennt und die bindenden nach entsprechenden Waschschritten eluiert.⁴³ Anschließend können diese Nucleinsäuren amplifiziert und in der nächsten Runde eingesetzt werden. Bei DNA erfolgt diese Amplifikation mittels PCR und anschließender Strangtrennung und bei RNA mittels RT-PCR und T7-Transkription. Abhängig von der Schnelligkeit der Anreicherung und der Art der Methode bindender Spezies werden 1-20 Selektionsrunden durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Nucleinsäurebibliothek spezifisch an das Zielmolekül bindet, kann zusätzlich in jeder Selektionsrunde eine Prä-SELEX durchgeführt werden. Diese funktioniert ähnlich wie die Inkubation mit dem Zielmolekül. Allerdings werden nach Inkubation mit dem Nicht-Zielprotein die ungebundenen Nucleinsäuren aus dem Überstand in der eigentlichen SELEX eingesetzt. Somit lassen sich je nach Zielsetzung Nucleinsäuren aus der Bibliothek entfernen.⁵⁰

Nach der finalen Selektionsrunde werden die Nucleinsäuren der Bibliothek vereinzelt und sequenziert. Abschließende Bindungsanalysen führen dann zur Identifikation von Aptameren. Abbildung 10 zeigt den Ablauf einer SELEX schematisch.⁵⁰

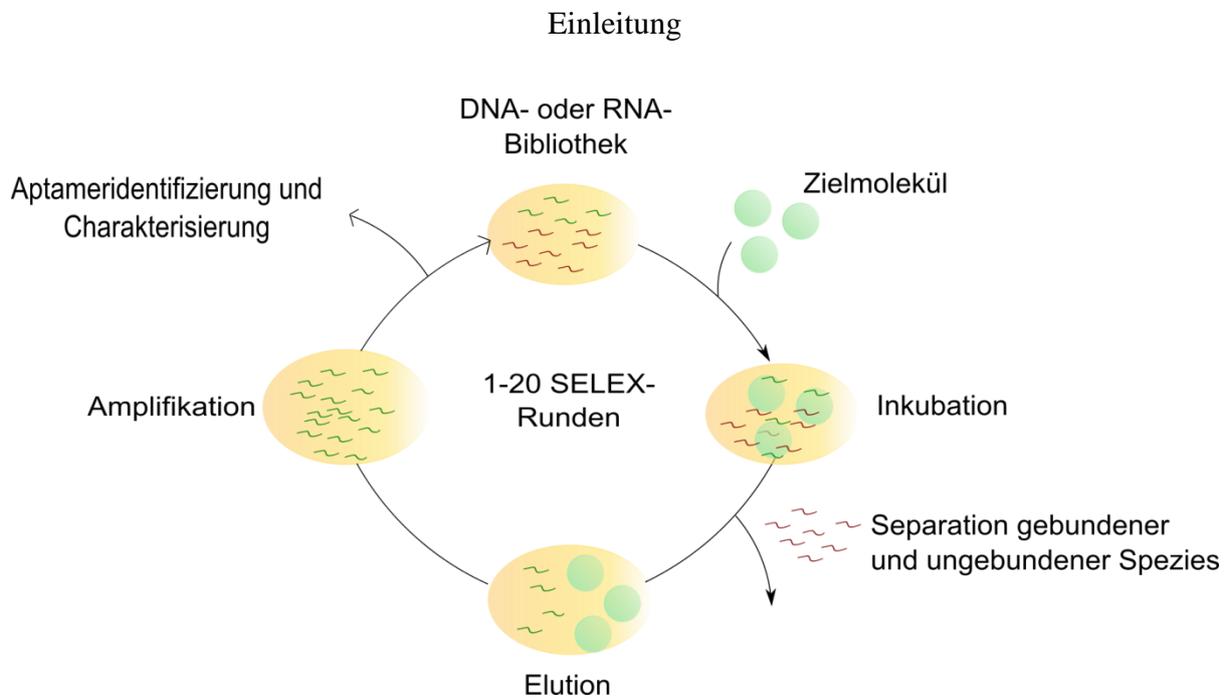


Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des SELEX-Verfahrens. Zunächst erfolgt die Inkubation einer DNA oder RNA Bibliothek mit dem Zielmolekül. Dieses kann ein Protein immobilisiert auf magnetischen Partikeln, aber auch eine ganze Zelle sein. Der kritischste Schritt der SELEX folgt dann durch Trennung gebundener von ungebundenen Nukleinsäuren. Die gebundenen Spezies werden eluiert und amplifiziert. Die so angereicherte Bibliothek kann in der nächsten Selektionsrunde eingesetzt werden. Nach der finalen Selektionsrunde, verifiziert durch eine Bindungsanalyse, erfolgt die Identifikation und Charakterisierung der erhaltenen Aptamere.⁵⁰

Der kritische Schritt während der SELEX ist die Trennung bindender von nicht bindenden Spezies. Deshalb wurden seit 1990 eine Reihe verschiedener Methoden zur Separation zielmolekülbindender Aptamere und nicht- oder unspezifisch bindender Oligonukleotide entwickelt. Eine der gängigsten Methoden und am leichtesten in der Anwendung ist die SELEX unter Verwendung von Proteinen immobilisiert auf magnetischen Partikeln. Dabei kann die Kopplung der Proteine mittels EDC/NHS, aber auch durch Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung erfolgen. Außerdem können Proteine über Tags immobilisiert werden. Die eigentliche Trennung erfolgt dann durch einen magnetischen Separator.^{50,51} Neben den magnetischen Partikeln kann die Trennung auch mittels Kapillarelektrophorese erfolgen. Dabei wird der Aptamer-Zielmolekülkomplex aufgrund seiner geringeren elektrophoretischen Mobilität im Gegensatz zu freien Nukleinsäuren beim Passieren einer Kapillare getrennt. Die Elution erfolgt durch Erhöhung des Druckes. Durch Anwendung dieser Methode konnten z.B. Mendosa und Browser die Anzahl an benötigten Selektionsrunden erstmals dramatisch senken.⁵²

Neben Protein-basierten Methoden ist aber auch eine SELEX mit ganzen Zellen möglich. Dabei wird die Nukleinsäurebibliothek direkt mit den Zielzellen inkubiert. Die Trennung von bindenden und nicht-bindenden Spezies kann entweder mittels Durchflusszytometrie,

Einleitung

Zentrifugation oder, im Falle adhärenter Zellen, direkt durch das Waschen der Zellkulturschale erfolgen.^{53,54} Der Vorteil der Zell-SELEX liegt darin, dass z.B. zur Unterscheidung von verschiedenen Krebstypen keine direkte Kenntnis über das Zielmolekül notwendig ist. So konnten Aptamere selektiert werden, die spezifisch Darm- oder auch Prostatakrebs nachwies.^{50,55,56} Neben dem Finden von tumorspezifischen Markern kann die Zell-SELEX ebenfalls genutzt werden, um spezifisch Aptamere zu selektieren, die in die Zielzellen aufgenommen werden. So berichteten Thiel *et al.* 2012 zum ersten Mal von der sogenannten Zellinternalisierungs-SELEX, mit der gezielt Aptamere zum Wirkstofftransport selektiert werden können.⁵⁷ Meyer *et al.* zeigten 2013 eine Weiterentwicklung der Zell-SELEX. Dabei entwickelten sie Zellen, die ihr Zielmolekül überexprimierten, und nutzten die Ursprungszellen in der Prä-SELEX, sodass Nukleinsäuren ausgeschlossen wurden, die nicht das Zielmolekül binden. Somit konnten sie Aptamere selektieren, die das Zielprotein in ihrer natürlichen Konformation banden.⁵⁸

Neben diesen bereits genannten SELEX-Methoden wurden im Laufe der Jahre noch viele weitere entwickelt, um den SELEX-Prozess zu optimieren oder um gezielt auf eine Fragestellung zu reagieren.⁵⁰ So entwickelten z.B. White *et al.* die *Toggle-SELEX*, bei der eine Kreuzreaktivität zweier homologer Zielmoleküle ausgenutzt wird, oder auch Cheng *et al.* eine *in vivo* SELEX, bei der direkt in der Maus selektiert wurde. Die resultierenden Aptamere waren dann in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^{59,60}

Nach Abschluss jeder dieser Methoden muss allerdings eine Vereinzelung der Nukleinsäuren der selektierten Bibliotheken erfolgen. Konventionell erfolgt diese mittels Klonierung. Eine Alternative dazu bietet das *Next Generation Sequencing*.⁶¹ Eine dieser Methoden ist das *Illumina Sequencing*, das in der nachfolgenden Abbildung näher erläutert wird (Abb.11).

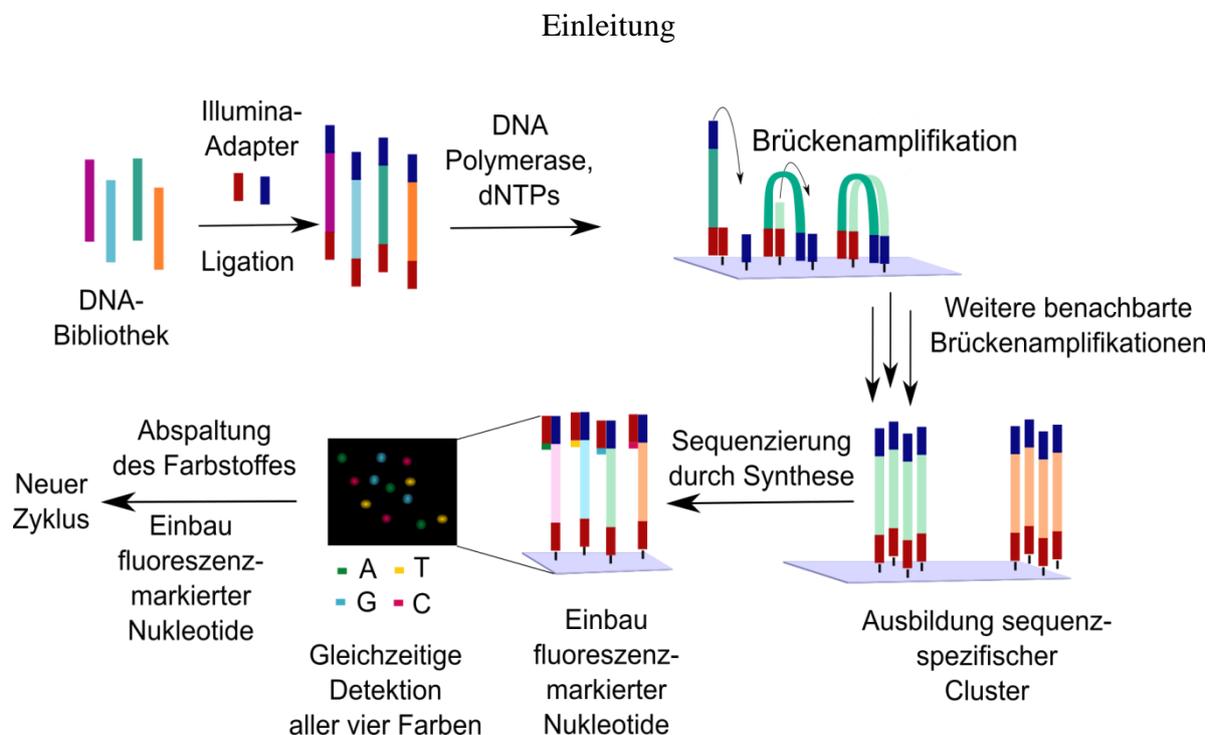


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Illumina-Sequenzierung. Zunächst erfolgt die Ligation der Illumina-Adapter an die DNA. Nachdem sich die Adapter an ihre Gegenstücke, immobilisiert auf einer Platte, angelagert haben, erfolgt durch Zugabe einer DNA-Polymerase sowie dNTPs die Brückenamplifikation. Das entstehende Produkt steht dann für weitere Amplifikationen zur Verfügung und es bildet sich ein sequenzspezifisches Cluster. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt dann durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Nucleotide mittels Festphasensynthese. Dabei besitzt jede Nucleotidart seine eigene Fluoreszenz, sodass gleichzeitig alle vier Nucleotide detektiert werden können. Durch die vorherige Clusterbildung wird in einem kleinen Gebiet der gleiche Farbstoff detektiert, sodass die verschiedenen Signale gut differenziert werden können. Nach der Detektion des ersten Nucleotides wird dessen Farbstoff abgespalten und ein neues fluoreszenzmarkiertes Nucleotid kann im nächsten Zyklus eingebaut werden. (modifiziert nach Anandhakumar *et al.*⁶¹)

Während bei der konventionellen Klonierung nur eine begrenzte Anzahl an Klonen und somit nur die hochfrequentierten Nucleinsäuren gefunden werden können, kann beim *Next Generation Sequencing* die gesamte Bibliothek analysiert werden. Dabei kann nicht nur die finale Bibliothek sequenziert werden, sondern auch die komplette Anreicherung während der SELEX beobachtet werden.⁵⁰ Zusätzlich dazu zeigten Dupont *et al.* erst kürzlich, wie wertvoll die Kombination der SELEX mit dem *Next Generation Sequencing* sein kann.⁶² Dabei führten sie zur Anreicherung fünf Selektionsrunden durch. Darauf folgte eine Verzweigung der Bibliothek und die letzte SELEX-Runde wurde sowohl mit dem Wildtypprotein als auch mit Mutanten des Proteins durchgeführt. Alle resultierenden Bibliotheken konnten dann mittels *Next Generation Sequencing* analysiert werden. Somit konnten Aptamere identifiziert werden, die spezifisch an bestimmte Epitope des Proteins binden. Somit kann z.B. zwischen einem aktiven und einem inaktiven Protein unterschieden werden.⁶² Die Weiterentwicklung diverser SELEX-Strategien wird auch zukünftig weitere Anwendungsmöglichkeiten schaffen. Im nachfolgenden Kapitel wird auf die bisher möglichen Anwendungsgebiete eingegangen.

1.2.2 Aptamere und ihre Anwendung

Aufgrund der hohen Zahl an bereits selektierten Aptameren bietet sich auch eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten. Die nachfolgende Abbildung zeigt einen Überblick.

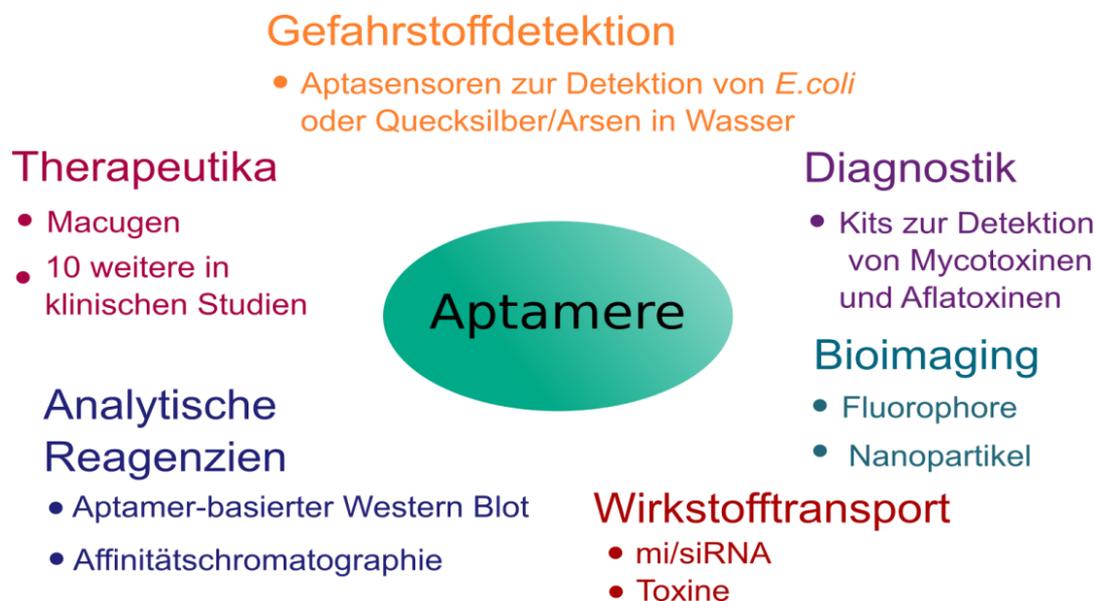


Abbildung 12: Anwendungsbereiche, in denen Aptamere bereits genutzt werden (modifiziert nach Darmostuk *et al.*⁵⁰). Aptamere werden in der Diagnostik, beim Bioimaging und im Wirkstofftransport eingesetzt. Ähnlich wie Antikörper können sie für eine Western-Blot-Analyse oder auch für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Mit ihnen lassen sich Gefahrenstoffe detektieren und sie befinden sich auf dem Weg zur Anwendung als Therapeutika.

Mittlerweile wurden Schnelltests auf Aptamerbasis zur Detektion von Toxinen in der Diagnostik entwickelt,^{63,64} aber auch zur Gefahrstoffdetektion. Diese Aptasensoren können Bakterien wie *E. coli*, aber auch Metalle wie z.B. Quecksilber mit einer Sensitivität von 5 fM nachweisen.^{44,45} In der biologischen Bildgebung lassen sich durch Fluorophor-modifizierte Aptamere oder auch durch Kopplung von Aptameren an Nanopartikel z.B. Tumore nachweisen.⁶⁵ Dabei können an Nanopartikel gekoppelte Aptamere neben der Bildgebung auch im Wirkstofftransport eingesetzt werden. So haben z.B. Zhao *et al.* Aptamer-Doxorubicin auf Goldnanospheren immobilisiert und somit selektiv Lymphom-Tumore angesteuert und abgetötet. Nanopartikel bieten die Möglichkeit, eine große Menge der Wirkstoffe zu transportieren.⁶⁶ In manchen Fällen kann aber auch eine direkte Kopplung des Wirkstoffes an das Aptamer ausreichen. So entwickelten Dai *et al.* eine MUC1-DNA-Aptamer-miRNA-29b-Chimäre entwickelt, die signifikant zur Apoptose der Zelle führt.⁶⁷ Zusätzlich lassen sich Aptamere, ähnlich wie Antikörper, auch als analytische Reagenzien z.B. im Western Blot oder der Affinitätschromatographie einsetzen.⁵⁰

Einleitung

Eine der wichtigsten Anwendungsgebiete von Aptameren ist die Nutzung als Therapeutika. Leider sind nur wenige der selektierten Aptamere in der Lage, ihre Zielmoleküle zu inhibieren bzw. zu stimulieren. Zurzeit ist nur das Aptamer Macugen zur Behandlung der feuchten Makuladegeneration zugelassen. Zehn weitere Aptamere zur Behandlung der Makuladegeneration, der Blutgerinnung, in der Onkologie sowie bei Entzündungsreaktionen sind in klinischen Studien.⁶⁸ Abbildung 13 zeigt diese Aptamere in Bezug auf die Phasen in denen sie sich befinden.

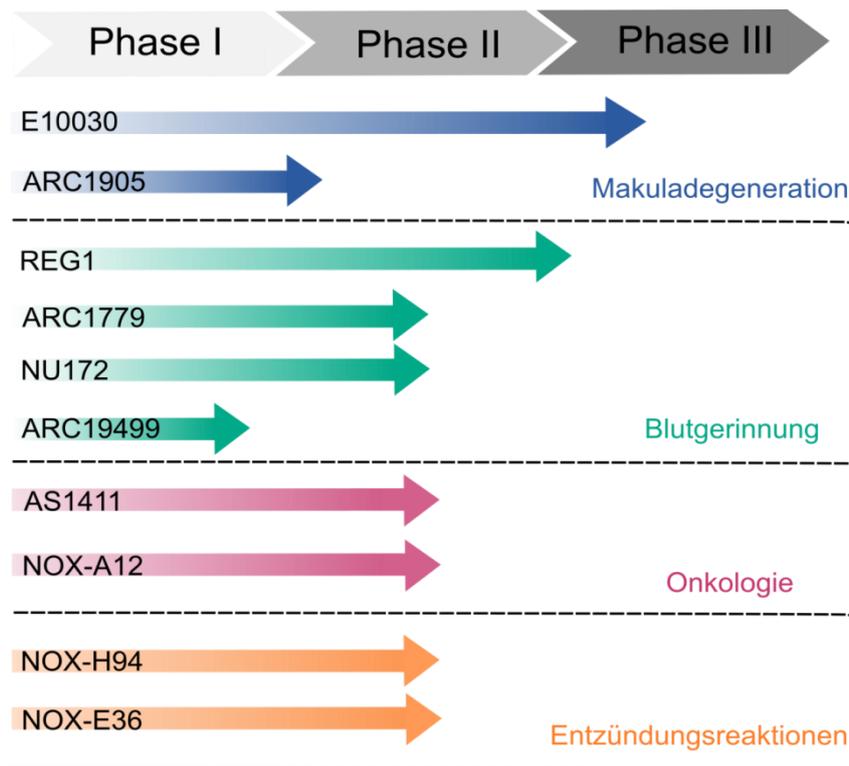


Abbildung 13: Aptamere in klinischen Studien zur Behandlung der Makuladegeneration, der Blutgerinnung, in der Onkologie sowie bei Entzündungsreaktionen (Stand 2015). (modifiziert nach Lao *et al.*⁶⁸)

Im Bereich der Makuladegeneration hat die Firma Ophthotech zwei Kandidaten in klinischen Studien, wobei das PDGF-B inhibierende DNA-Aptamer E10030 (Fovista) zusammen mit dem monoklonalen Antikörper Lucentis[®], das VEGF blockiert, bereits in Phase III der Behandlung der feuchten Makuladegeneration (clinical trial ID NCT01940900) ist.⁶⁹ Zur Behandlung der trockenen Form setzt das Unternehmen auf das Anti-C5-RNA-Aptamer (ARC1905).⁷⁰ Dieses befindet sich zurzeit in Phase I.

Das größte Anwendungsgebiet der Aptamere liegt zurzeit aber in der Behandlung der Blutgerinnung. Am weitesten fortgeschritten ist dabei mit Phase III das Aptamer REG1 (Regado Bioscience), das bei Patienten mit Erkrankungen der Koronararterien eingesetzt

wird.⁷¹ In der Onkologie sind zwei Aptamere in klinischen Studien. Zum einen das AS1411 (Antisoma), das über 80 verschiedene Krebsarten inhibiert⁷² und zum anderen das NOX-A12 (NOXXON), das das Chemokin CXCL-12 inhibiert und somit eine mögliche Metastasierung verhindert.⁷³ Das NOX-A12 ist ein sogenanntes Spiegelmer, das aus L-Form RNA besteht. Diese weist eine höhere Stabilität im Gegensatz zur D-Form auf. Weitere Spiegelmere der Firma Noxxon sind auch bei Entzündungsreaktionen in Phase II der klinischen Studien.^{68,74,75}

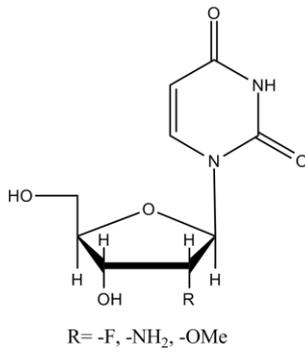
1.2.3 Modifikation von Aptameren

Die geringe Anzahl therapeutischer Aptamere hängt auch damit zusammen, dass ihre pharmakokinetischen und systemischen Eigenschaften unterschiedlich sein können und damit schwer vorherzusagen sind. Aufgrund ihrer kleinen Größe sind sie zudem anfällig für renale Filtration, und vor allem RNA-Aptamere sind leicht zu hydrolysieren. Durch DNasen bzw. RNasen können sie abgebaut werden und besitzen so kürzere Halbwertszeiten im Körper als z.B. Antikörper.⁷⁶ Zur Überwindung dieser Nachteile können Aptamer präselektiv oder postselektiv modifiziert werden. So kann z.B. durch eine Kopplung mit großen Polyethylenglykolenankern eine renale Filtration verhindert werden.⁷⁶

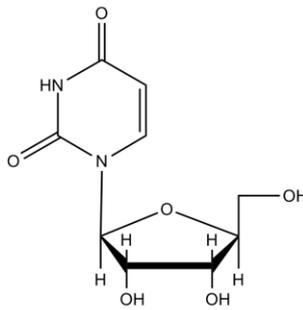
Zur Erhöhung der Stabilität spielt vor allem die 2'-OH-Gruppe von RNA eine wichtige Rolle. Diese wird durch RNasen oder auch unter alkalischen Bedingungen deprotoniert. Der nukleophile Sauerstoff greift die benachbarte 3'-OH-Gruppe an und es bildet sich ein zyklischer Übergangszustand, bei dem der Sauerstoff am 3'-Ende entfernt wird. Somit erfolgt ein Kettenabbruch.^{77,78} Da somit unmodifizierte RNA im Serum innerhalb weniger Sekunden degradiert wird, ist eine Derivatisierung der 2'-OH-Gruppe sehr wichtig.⁷⁹ Dabei lassen sich z.B. 2'-Deoxy, 2'-Amino, 2'-Fluoro, 2'-Azido und 2'-O-Methyl-Modifikationen enzymatisch während der T7-Transkription einbauen. Eine weitere Möglichkeit, die Degradation durch RNasen bzw. DNasen zu verhindern, bieten Spiegelmere, da sie aus L- anstatt D-Ribosen bestehen. Dabei erfolgt die SELEX mit natürlichen D-DNAs bzw. -RNAs gegen ein Spiegelbild des Zielmoleküls. Dies ermöglicht dann die Spiegelung des selektierten Aptamers, das dann das natürliche Zielmolekül bindet. Den Erfolg dieser Strategie zeigen drei Aptamere, die sich bereits in klinischen Studien befinden.⁷³⁻⁷⁵ Neben der Spiegelung sind aber auch noch andere Modifikationen wie z.B. durch *locked nucleic acids* (LNA) oder auch Xeno-Nukleinsäuren (XNA) möglich (Abbildung 14).⁸⁰⁻⁸²

Einleitung

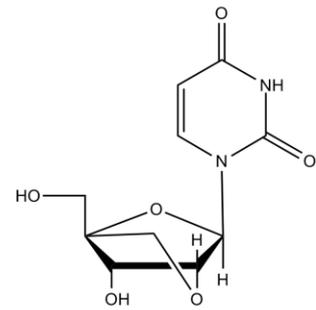
A 2' Modifizierungen



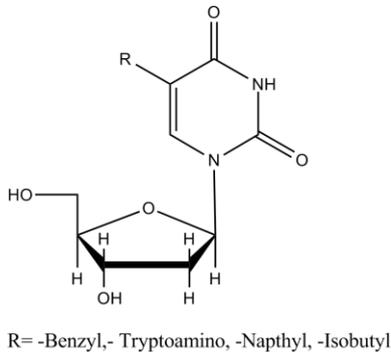
B Spiegelmer



C LNA



D SOMAmer



E Ds:Px

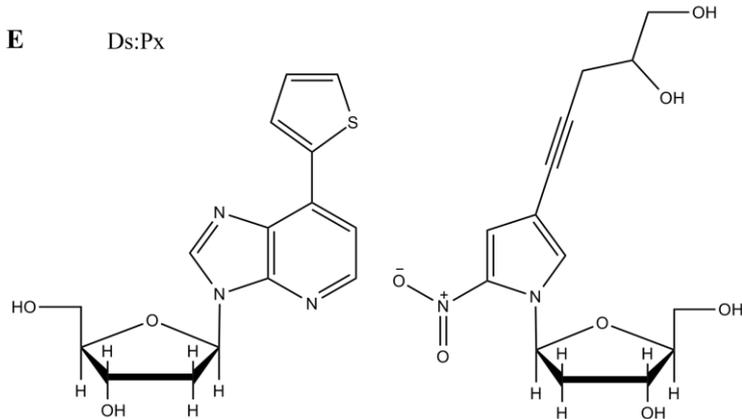


Abbildung 14: Möglichen Modifikationen von Nukleinsäuren. A) Modifikation an der 2'-Position am Beispiel des Uracils. Dies kann sowohl eine Fluor-, als auch eine Amino- oder *O*-Methyl-Modifikation sein. B) Spiegelmer. Anstatt einer D-Konfiguration besitzt das Spiegelmer eine L-Konfiguration. C) *Locked Nucleic Acids*. Diese besitzen eine Brücke zwischen dem 2'- und dem 5'-C-Atom. D) SOMAmer. Diese besitzen an den Basen Modifikationen wie z.B. Benzyl- oder Naphthyl-. E) Xeno-RNA. Einführung eines neuen Basenpaares. Rechts: 7-(2-Thienyl)imidazo[4,5-b]pyridin (Ds); links: 2-Nitro-4-Propynylpyrrol (Px).⁸³⁻⁸⁶

Diese XNAs erhöhen dabei auch noch den genetischen Code und somit auch die Komplexität möglicher bindender Strukturen. Zum Beispiel entwickelten Kimoto *et al.* ein Ds:Px-Basenpaar, das sich mittels DNA-Replikation vervielfältigen lässt.⁸³ Dabei besitzt das Px-Nukleotid ein Azid, durch das sich nach der Amplifikation weitere funktionelle Gruppen einbringen lassen. Dies kann nicht nur zu einer Erhöhung der Stabilität führen, sondern auch die Affinität und auch Spezifität beeinflussen.^{83,84} Eine Erweiterung des genetischen Codes nutzen auch die sogenannten SOMAmere (*Slow Off-rate Modified Aptamers*), deren Nukleosidtriphosphate hydrophobe Gruppen, wie z.B. Benzyl- oder Naphthyl- aufweisen.⁸⁶ Diese führen durch entstehende hydrophobe Wechselwirkungen zu einer höheren Affinität der Aptamere.⁸⁴ Während die Ds:Px Nukleotide während des SELEX-Prozesses eingesetzt werden können, erfolgt die Modifikation der SOMAmere postselektiv.^{83,86}

2. Zielsetzung

Das $\alpha6\beta4$ -Integrin gehört zur Gruppe der Laminin-bindenden Integrine. Dabei führt die Bindung des Integrins an Laminin zur Ausbildung von Hemidesmosomen und somit zu einer festen Bindung der Zelle an seine Umgebung. Krebszellen, die das $\alpha6\beta4$ Integrin ebenfalls präsentieren, nutzen die Lamininbindung sowie die dadurch ausgelösten Signalwege, die sonst z.B. in der Wundheilung eine Rolle spielen, zur Förderung des Tumorzellwachstums und zur Metastasierung. Dabei führt eine höhere Präsentation des Integrins auf Krebszellen oft zu einer schlechteren Prognose des Patienten. Deshalb ist die Inhibition der Interaktion zwischen Laminin und dem $\alpha6\beta4$ Integrin von hohem therapeutischem Interesse.

Neben der Verwendung von Antikörpern als Inhibitoren dieser Interaktionen wäre auch die Verwendung von Aptameren möglich. Da es bis dato keine Aptamere gab, die in der Lage waren, die Laminin- $\alpha6\beta4$ -Integrin-Bindung zu blockieren, lag das Ziel dieser Arbeit in der Selektion und Charakterisierung entsprechender inhibierender DNA-Aptamere.

Die Selektion von DNA-Aptameren für die native Konformation des $\alpha6\beta4$ Integrins sollte mittels Zell-SELEX erfolgen. Dabei sollte die Prostatakrebszelllinie PC-3 in der eigentlichen SELEX eingesetzt werden, während die nötige Integrin-Spezifität mittels Prä-SELEX unter Verwendung von PC-3- $\beta4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen sichergestellt werden sollte. Nach erfolgreicher SELEX sollte neben der Affinität und Spezifität der erhaltenen Nukleinsäure(n) auch deren Fähigkeit zur Inhibition der Integrin-Laminin-Interaktion ermittelt werden. Eine umfassende Charakterisierung sollte zudem die Analyse der Struktur, Stabilität und die mögliche Internalisierung in Zielzellen umfassen. Außerdem sollte eine Verkürzung und Modifikation des bestgeeigneten Aptamers zu dessen Optimierung ins Auge gefasst werden.

3. Material

3.1 Chemikalien

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

3.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Allgemeine Puffer und Lösungen zur Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren

Puffer	Zusammensetzung
Caropuffer (3x)	120 mM Tris-HCL pH 8.1, 15 mM DTT, 6 mM Spermidin, 0.03% (v/v) Triton-x-100, 4.5% (w/v) PEG 6000
DNase I Reaction Buffer (10x)	Thermo Scientific
DreamTaq™ Buffer (10x)	Thermo Scientific
Elutionspuffer	0.3 M Natriumacetat, pH 5.2
FastAP™ Buffer (10x)	100 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 37°C), 50 mM MgCl ₂ , 1 M KCl, 0.2% Triton X-100, 1 mg/mL BSA.
Lamda Exonuclease-Puffer (10x)	670 mM Glycin-KOH (pH 9.4), 25 mM MgCl ₂ , 0.1% (v/v) Triton X-100
Orange DNA Loading Dye (6x)	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% Orange G, 0.03% Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA

Material

Puffer	Zusammensetzung
PNK-Puffer A (10x)	500 mM Tris-HCl, (pH 7.6), 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA
RNA-Markierungspuffer	10 mM EDTA, 1 M Urea, 100mM, Tris-HCl, pH 7.4
RNA-Ladepuffer (2x)	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-Base, 250 mM Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7.8

Tabelle 2: Allgemeine Puffer und Lösungen zur Proteinanalyse

Puffer	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer (4x)	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS
SDS-Laufpuffer (5x)	0.125 M Tris, pH 8.3, 0.96 M Glycin, 0.5% SDS
SDS-Proteinladepuffer (2x)	125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0.002% (w/v) Bromphenolblau, 4 mM DTT
Trenngelpuffer (4x)	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS

Tabelle 3: Puffer und Lösungen zur Aptamerelektion und Charakterisierung

Puffer	Zusammensetzung
Binde- und Waschpuffer (2x)	100 nM Natriumphosphat, 600 mM NaCl, 0.02% Tween [®] -20, pH 8.0
Blockierungs- und Lagerungspuffer	1xPBS, 0.1 % Ethanolamin, 0.05 % Natriumazid
MES-Puffer	0,1 M MES, pH 5,0
PBS (10x)	1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 65 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.35
SELEX-Puffer	1x PBS, 3 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , pH 7.35

3.3 Enzyme

DreamTaq [®] DNA Polymerase	Life Technologies
FastDigest [®] EcoRI	Life Technologies
FastDigest [®] HindIII	Life Technologies
Lambda Exonuclease	Life Technologies
SuperScript [®] III Reverse Transkriptase	Life Technologies
T4 DNA Ligase	Life Technologies
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Life Technologies
T7-RNA-Polymerase Y639F	Eigene Herstellung

3.4 Proteine und Antikörper

Anti-Integrin beta 4 Antikörper,(ASC-3)	Millipore
Anti-Integrin beta 4 Antikörper, (ASC-8)	abcam

Material

Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-FITC	Southern Biotech
Laminin-332	Biolamina
rhIntegrin alpha 6 (X1) beta 4	R & D Systems
rmIntegrin alpha 6 beta 4	R & D Systems
rhIntegrin alpha 6 beta 1	R & D Systems
rhIntegrin alpha 4 beta 1	R & D Systems

3.5 Protein- und Nukleinsäure-Standards

GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
RiboRuler Low Range RNA Ladder	Thermo Scientific

3.6 Nukleotide und Radionukleotide

2'-Fluoro-2'-dCTP	Metkinen Chemistry
2'-Fluoro-2'-dUTP	Metkinen Chemistry
Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth
Guanosine-5'-O- monophosphorothioate (5'-GMPS)	BioLog
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Roth
γ -[32P]-ATP	Hartmann Analytics

3.7 Materialien zur Aptamerselektion

Magna-Sep™ Magnetic Particle Separator	Life Technologies
SiMAG- Carboxylbeads	Chemicell GmbH

3.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide (Tab. 4) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) in HPLC-gereinigter Form bezogen.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung dargestellt

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
102	CACTCATAGGAAGAGGGCCCTCTGTTGATCATCCCCGC
103	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCTTCCTTCGAGTCCGGGATAaCCCTG GTATCTGGTCGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
104	GCctgtTGTGAGCCTCctAACCCgtaCCGTTACcAtACgtCCCTaGt TGCCatgCTtaTTCTTGTCTCCC
1217	GCctgTtGTGAGCCTCCTAACCTTGTTCGACGTGGGATTGCTCGTGCT GTTATGTTGTGTCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1228 (IDA)	GCctgTtGTGAGCCTCCTAACCGTTCGTATTCGTACTGGAAGTATA TCGATGTCCCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1232	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGCATGGTGTATCCCTAATCCCTCG GTACCCTGGTGACCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1236	GCctgTtGTGAGCCTCctAACACCgTCATGTCCGTATTGTACCGtt gAGATTCCCACGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1241	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGTCCTGCGGTTTAATGTCTTCTGCTA GCTATTCCTTGTGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1245	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGTCCTCGGATTACTGCTGTGTGGTAC CTTTTACCTGGGCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
1250	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTAGTTCCTCCACATTACCCGTTGCC GATGTATCCGCCCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
Bibliothek I	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-N39-CATGCTTATTCTTGTCTCCC
Fw Primer	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
Fw Primer Eco R1	ATGCGAATTCGCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
Rev Primer- Phosphat	[Phosphat]GGGAGACAAGAATAAGCATG
Rev Primer Hind III	ATGCAAGCTTGGGAGACAAGAATAAGCATG

Tabelle 5: Verwendete fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
Kontroll-DNA-Cy5	[Cyanine5]GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGAGGAGTGGGCTAAAGGTA TGTTGTGGGTTTGGTTCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
IDA-Cy5	[Cyanine5]GCctgTtGTGAGCCTCCTAACCGTGCATTCGTACTGGA ACTGATATCGATGTCCCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
IDA-A-Cy5	[Cyanine5]CGTATTCGTACTGGAAGTATCGATGTCCCCATGCTTA TTCT
IDA-B-Cy5	[Cyanine5]CGTGCGTATTCGTACTGGAAGTATCGATGTCCC
1236-Cy5	[Cyanine5]GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACACCGTCATGTCCGTATTG TACCGTTG
Fw Primer-Cy5	[Cyanine5] GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC

3.9 Kommerziell erhältliche Kits

High Yield PCR Clean-up Gel Extraktion	SLG
HiYield® Plasmid Mini Kit	SLG
Micro Bio-Spin 30 Columns	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega

3.10 Medien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Accutase	PAN Biotech
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech
Fetales Kälberserum	PAN Biotech
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech
Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI-1640)	PAN Biotech

Material

SOC-Medium	PAN Biotech
Opti-MEM [®] Reduced Serum Medium	Life Technologies
Lipofectamine [®] 2000 Reagent	Life Technologies

3.11 Bakterienstämme und Vektoren

E. coli TOP10 (Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) und pUC19 (pCR[®]2.1-TOPO[®]) wurden von der Firma Life Technologies käuflich erworben.

3.12 Zelllinien

Die humanen Prostata Karzinom (PC-3) Zellen sowie die PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen wurden freundlicherweise von Tobias Lange (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zu Verfügung gestellt.

4. Methoden

4.1 Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren

4.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei wird zunächst die DNA bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgt bei 55-65 °C die Anlagerung kurzer DNA-Oligonukleotide, Primer genannt, die jeweils am 3'-Ende des komplementären Stranges hybridisieren. Sie begrenzen die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Somit kann eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase die Stränge auffüllen. Durch Wiederholen dieses Temperaturprogrammes (Tabelle 6) erfolgt die exponentielle Anreicherung des DNA-Abschnittes (DNA-Template). Der entsprechende PCR-Ansatz in Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 6: Temperaturprogramm der RT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	5-20
Primeranlagerung	60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	4 °C	∞	1

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
DNA-Template	1-50 μL	< 1.0 μM
PCR-DreamTaq-Puffer 10x (inkl. 20 mM MgCl_2)	10 μL	1x
dNTP-Mix (25 mM)	2 μL	500 μM
Reverser Primer (100 μM), 5'-phosphoryliert	1.0 μL	1.0 μM
Vorwärtsprimers(100 μM)	1.0 μL	1.0 μM
DreamTaq TM DNA-Polymerase (5 U/ μL)	0.5 μL	1.25 U/100 μL
Aqua dest.	Ad. 100 μL	

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne ss/dsDNA-Template. Die Analyse der PCR erfolgte mittels einer nativen PAGE (10%iges PAA-Gel) (4.2.2).

4.1.2 Strangtrennung von doppelsträngiger DNA

Die Strangtrennung der doppelsträngigen DNA erfolgte mittels Lambda Exonuclease. Diese 5'→3' Exodeoxyribonuklease degradiert nur den 5'-phosphorylierten Strang doppelsträngiger DNA. Da nur der reverse Primer eine Phosphorylierung aufwies, wurde dieser spezifisch abgebaut. Die Zusammensetzung eines Ansatzes zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Strangtrennung von doppelsträngiger DNA.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
PCR-Ansatz	89.5 μL	
Lambda Exonuclease Puffer (10x)	10 μL	1x
Lambda Exonuclease	0.5 μL	0.05 U/ μL
Aqua dest.	Ad. 100 μL	

4.1.3 Kolonie-PCR

Zur Identifikation positiver rekombinanter Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende *E. coli*-Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze von einer Agarplatte gepickt und diente direkt als DNA-Template für die PCR-Reaktion (4.1.1). Zur Analyse der Kolonie-PCR wurde eine native PAGE (10%iges PAA-Gel) durchgeführt.

4.1.4 *In-vitro*-T7-Transkription unter Einbau von modifizierten Nukleotiden

Die Herstellung von 2'-Fluor-modifizierter mikroRNA erfolgte mittels *in-vitro*-T7-Transkription unter Einbau von 2'-Fluor-modifizierten Pyrimidin-Nukleotiden. Die Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes ist in der nachfolgenden Tabelle zu sehen.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines T7-Transkriptionsansatzes unter Verwendung 2'-Fluor-modifizierter Pyrimidin-Nukleotide.

Komponenten	Volumen	Finale Konz.
dsDNA-Templates	5 μ L	
MgCl ₂ (300 mM)	1.2 μ L	20 mM
Caropuffer (3x)	6 μ L	1x
ATP und GTP (50 mM)	0.72 μ L	2 mM
2'-F UTP (20 mM)	1.8 μ L	2 mM
2'-F CTP (20 mM)	1.8 μ L	2 mM
T7-RNA-Polymerase Y639F	1 μ L	5 U/ μ L
Aqua dest.	Ad. 18 μ L	

Die T7-Transkription erfolgte für 2 h bei 37 °C und wurde mittels eines 10%igen denaturierenden PAA-Gel analysiert. Anschließend erfolgte die Degradation der Template-DNA mittels DNase I.

4.1.5 DNA-Degradation mittels DNase I

Zur Entfernung des dsDNA-Templates nach der T7-Transkription wurde eine Degradation mittels DNase I durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes in Tabelle 10 zu sehen.

Tabelle 10: Reaktionsansatz zur Degradation von DNA.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
T7-Transkriptionsansatz	18 μL	-
DNase I Reaction Buffer (10x)	2.5 μL	1x
DNase I	0.5 μL	0.05 U/ μL
Aqua dest.	Ad. 25 μL	

Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C.

4.1.6 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren

Zur radioaktiven 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren erfolgte die 5'-terminale Phosphorylierung durch die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) mit γ -[³²P]-ATP. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz zur radioaktiven 5'-Endmarkierung.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
ssDNA	10 μL	< 1 μM
10x PNK-Puffer A	2.0 μL	1x
γ -[³² P]-ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	2.0 μL	1.0 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$
T4-PNK (10 U/ μL)	0.5 μL	0.25 U/ μL
Aqua dest.	Ad. 20 μL	

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend einer Isopropanolpräzipitation (4.2.7) und Reinigung mittels PAGE (10%iges, denat. PAA-Gel,

4.2.3) zur Abtrennung von nicht inkorporiertem γ -[³²P]-ATP unterzogen. Daraufhin erfolgte die Überprüfung der Markierung mittels eines 10% denat. PAA-Gel.

4.2 Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren

4.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Reinigung von Plasmiden wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung der verwendeten 1%igen Agarosegele wurden 0.5 g Agarose in 50 mL 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde in eine Flachbett-Elektrophoresekammer gefüllt und gelierte nach 20 Minuten. Die Plasmid-Lösung wurde mit 6x Ladepuffer versetzt, die Probe auf das Gel geladen und die Elektrophorese mit einer Spannung von 120 V 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (4.2.4) gefärbt.

4.2.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse sowie Reinigung von dsDNA wurde eine native Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung 10%iger Polyacrylamidgele durchgeführt. Die Durchführung von EMSAs (4.6.1) erfolgte mittels 5%iger PAA-Gele. Die verwendete Gelgröße sowie die Zusammensetzung der Gele sind in den folgenden Tabellen zu finden. Die Mengenangaben gelten für das Gießen von fünf Polyacrylamidgelen.

Tabelle 12: Verwendete Größe der Polyacrylamidgele für analytische und präparative Gele

Gelgröße	Maße
Analytische und präparative Gele	75 mm x 85 mm x 0.75 mm

Tabelle 13: Zusammensetzung 5%iger und 10%iger nativer Polyacrylamidgele.

Komponente	5%ige Gele	10%ige Gele
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (w/v)	-	12.5 mL
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5 : 1) (w/v)	8.3 mL	-
50xTAE	1 mL	1 mL
TEMED (0.1%) (v/v)	50 μ L	50 μ L
APS (0.1%) (w/v)	500 μ L	350 μ L
Aqua dest.	Ad. 50 mL	Ad. 50 mL

Dabei erfolgte die Initiation der Polymerisation durch die Zugabe von APS. Diese dauerte 30 Minuten. Zur Durchführung der nativen PAGE unter Verwendung 10%iger nativer Gele wurden zunächst die jeweiligen Proben mit 6x Orange DNA Loading Dye versetzt und dann auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 200 V und war nach 25 Minuten beendet. Die Durchführung des EMSAs ist detailliert Kapitel 4.6.1 zu entnehmen. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte bei analytischen Gelen mittels Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) und bei präparativen Gelen mittels UV-Shadowing (4.2.5).

4.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse und Reinigung von 2'-F-modifizierter RNA bzw. ssDNA erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese. Dazu wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet, deren Zusammensetzung analog Tabelle 12 ist. Die denaturierenden Bedingungen wurden durch die Zugabe von Harnstoff (8 M) hergestellt. Zur Probenvorbereitung wurden diese mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt. Nach Auftragung erfolgte die Gelelektrophorese bei 8 W für 30 Minuten. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) oder UV-Shadowing (4.2.5).

4.2.4 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid

Der Nachweis von Nukleinsäuren erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr). Dieser kationische, heterozyklische Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix, wodurch sein Anregungsspektrum verschoben wird. Die Färbung der analytischen PAA-Gele erfolgte durch 5 minütige Inkubation in einer EtBr-haltigen Lösung (4 µg EtBr pro mL 1x TAE). Die Nukleinsäurebanden konnten dann unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm detektiert werden.

4.2.5 Nachweis von Nukleinsäuren mittels UV-Shadowing

Der Nachweis von Nukleinsäuren bei präparativen Polyacrylamidgelen erfolgte mittels UV-Shadowing. Dabei wurde das charakteristische Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm ausgenutzt, sodass eine Färbung des Gels nötig war. Zunächst wurde das Gel in eine Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, welche mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war. Daraufhin konnten durch Anregung des Farbstoffes mit UV-Licht der gleichen Wellenlänge die Nukleinsäuren als dunkle Banden sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden dann ausgeschnitten und einer Diffusionselution (4.2.6) unterzogen.

4.2.6 Diffusionselution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Die nach UV-Shadowing (4.2.5) ausgeschnittenen Nukleinsäure enthaltenden Gelstücke wurden mit 600 µl Natriumacetat (0.3 M) versetzt und 2 h bei 1000 rpm und 50 °C inkubiert. Mit dem Eluat wurde dann eine Isopropanolpräzipitation (4.2.7) durchgeführt.

4.2.7 Isopropanolpräzipitation

Zunächst erfolgte die Zugabe des äquivalenten Volumens an eiskaltem Isopropanol zur Probe. Anschließend wurden 1 µl Glycogen und ein Zehntel des Gesamtvolumens an 3 M Natriumacetat (pH 5.4) hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und 30 min bis 48 h zum Erhalt einer höheren Ausbeute bei -20 °C inkubiert. Anschließend folgte eine 30 minütige Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 16100 xg. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 50 µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Nach weiteren 5 min

Zentrifugieren bei 4 °C und 16100 xg wurde der Überstand erneut abgenommen, das Pellet 15 min bei 37 °C getrocknet und in Aqua dest. resuspendiert.

4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) am NanoDrop ND-1000 bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 ng dsDNA/ μ L, 40 ng ssDNA/ μ L und 33 ng RNA/ μ L. Durch das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} lässt sich zusätzlich die Reinheit der Nukleinsäuren überprüfen, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Ein Verhältnis von 1.8-2.0 zeigt eine hohe Reinheit von 70-95%.

4.3 Methoden zur Proteinanalyse

4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen. Dabei bildet das Protein mit dem Natriumdodecylsulfat (SDS) einen Komplex, der die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli.⁸⁷

Für die SDS-PAGE wurden 15%ige SDS-PAA-Gele verwendet. Diese bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 14 und 15 zu sehen.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels für ein 15%iges SDS-PAA-Gel

Komponenten	Volumen
Acrylamid:Bisacrylamid 30 % 37.5:1	2 mL
Trenngelpuffer (4x)	3.75 mL
Aqua dest.	9.2 mL
APS	100 μ L
TEMED	10 μ L

Tabelle 15: Zusammensetzung des Trenngels für ein 15%iges SDS-PAA-Gel.

Komponenten	Volumen
Acrylamid:Bisacrylamid 30 % 37.5:1	15 mL
Trenngelpuffer (4x)	7.5 mL
Aqua dest.	7.4 mL
APS	150 μ L
TEMED	15 μ L

Die Proben wurden mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt, 2 min bei 80 °C inkubiert und auf ein 15%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Färbung der Proteinbanden mittels Coomassie Brilliant Blue (4.3.2).

4.3.2 Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Färbung von Proteinen in SDS-PAA-Gelen erfolgte für 12 h unter Schwenken in einer Coomassie-Färbelösung.

4.3.3 Kopplung von Proteinen an SIMAG-Carboxylbeads

Zur Kopplung von Proteinen an käuflich erworbene SiMAG-Carboxyl Beads wurden 200 μ L (10 mg) der Beads zweimal mit je 1 mL MES-Puffer gewaschen. 10 mg EDC wurden daraufhin in 250 μ L MES-Puffer gelöst und die Beads darin aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur wurden 100 pmol des entsprechenden Proteins hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h auf Eis. Danach wurden die Beads dreimal mit je 1 mL PBS gewaschen und in 750 μ L Blockierungs- und Lagerungspuffer aufgenommen.

4.4 Selektion von Aptameren

4.4.1 *In vitro* Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für das $\alpha\beta4$ Integrin

Zur Selektion von Aptameren für das $\beta4$ Integrin wurde zunächst eine Zell-SELEX unter Verwendung $\beta4$ Integrin präsentierender PC-3-Zellen durchgeführt. Dabei wurden zunächst 200.000 PC-3 Zellen in einer Kultivierschale ausgesät und weiter kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden 500 pmol des ssDNA-Pools in 500 μL SELEX-Puffer hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Nukleinsäuren durch Waschen mit 500 μL SELEX-Puffer entfernt. Dabei wurde die Anzahl der Waschschriffe variiert. Die Elution der gebundenen Fraktion erfolgte mittels 50 μL 80 °C heißem Wasser und Inkubation für 5 min bei 80 °C. Zur Amplifikation gebundener Nukleinsäuren wurde eine PCR (4.1.1) und anschließend zum Erlangen einzelsträngiger DNA eine Strangtrennung (4.1.2) durchgeführt.

Ab Runde 3 wurde zusätzlich zum obigen Protokoll vor der eigentlichen SELEX-Runde eine Prä-SELEX durchgeführt. Dazu wurde der Pool der vorherigen Runde zunächst mit PC-3- $\beta4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und in der eigentlichen SELEX eingesetzt.

Ab Runde sechs erfolgte die weitere Anreicherung des Pools mittels einer konventionellen SELEX. Dazu wurde der Pool aus Runde fünf mit 80 μL Integrin $\alpha\beta4$ beladenen magnetischen Beads (4.3.3) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Abtrennung ungebundener Nukleinsäuren erfolgte nun mittels magnetischer Separation. Die Elution erfolgte weiterhin mittels Hitze. Ab Runde elf wurde zusätzlich Laminin-332 in der SELEX eingesetzt, um Nukleinsäuren zu erhalten, die die Laminin-Integrin-Bindung inhibieren können.

4.5 Klonierungsmethoden

4.5.1 Restriktion des Vektors pUC-19

Die PCR-Produkte der jeweiligen Selektionsrunden wurden in den Vektor pUC19 kloniert. Dazu erfolgte zunächst die Restriktion des Vektors durch die Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII. Abbildung 15 zeigt die Schnittstellen der Enzyme in der *Multiple cloning site* des Vektors pUC19. Die markierte Sequenz wird bei der Restriktion entfernt.

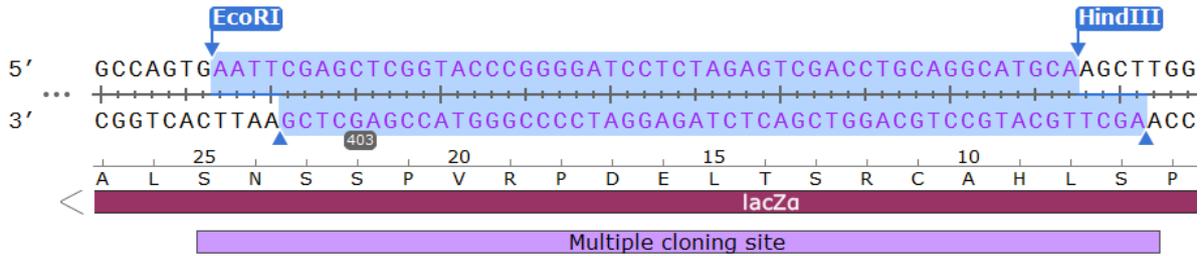


Abbildung 15: Darstellung der Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII.

Der entsprechende Reaktionsansatz ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes

Komponente	Volumen
pUC19	10 µL
10x FastDigest Green Puffer	5 µL
FastDigest EcoRI	1 µL
FastDigest HindIII	1 µL
Aqua dest.	Ad. 50 µL

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors durch Zugabe von 1 µL FastAP und Inkubation bei 37 °C für 30 min. Die Analyse und Reinigung der Restriktion erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese (4.2.1).

4.5.2 Ligation

Für die Ligation wurden 100 ng des geschnittenen Vektors pUC19 (4.5.1) mit einem molaren Überschuss von 1:3 und 1:5 des geschnittenen PCR-Produktes gemischt und 0.5 µL T4-DNA-Ligase, sowie 2 µL 10 x T4-Ligase Puffer hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde ü.N. bei 16 °C

inkubiert und zum Inaktivieren des Enzym 20 min auf 80 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Transformation (4.5.3).

4.5.3 Transformation kompetenter Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation kompetenter *E. coli* Top 10 Zellen wurden zu je 50 µL kompetenter Zellen jeweils 5 µL des jeweiligen Ligationsansatzes pipettiert und in die vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation bei 1.8 kV. Daraufhin wurden schnellstmöglich 450 µL SOC-Medium hinzugefügt und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden nun 30 min bei 37 °C und 400 xg inkubiert. Jeweils 100 µL der Probe wurden auf Ampicillin-haltige LB-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte mit den rekombinanten Klonen eine Kolonie-PCR.

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

Die Plasmid-DNA wurde aus den *E. coli* Zellen mit dem HiYield® Plasmid Mini Kit analog den Angaben des Herstellers isoliert.

4.5.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Aufklärung der Sequenz des in die Plasmide ligierten PCR-Produktes wurden die isolierten Plasmide von der Firma GATC unter Verwendung des Primers PCR1 (GATC) sequenziert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mithilfe der Software EditSeq und MegAlign.

4.6 Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktion

4.6.1 *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Aptamer-Protein-Interaktionen bietet das *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA). Zur Durchführung wurden konstante Mengen (< 1 nM) an radioaktiv markierter ssDNA mit 1000 nM des jeweiligen Proteins bzw. als Kontrolle 0 nM des Proteins für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde 1 µL 6xDNA-LD dazugegeben und die Proben auf ein 5 % natives PAA-Gel aufgetragen. Die native PAGE lief bei 4 °C bei 60 V für 2 Stunden. Daraufhin wurden die Gele eingefroren und mittels Autoradiographie analysiert.

4.6.2 Filter-Retentions-Assay

Die Untersuchung von Aptamer-Protein-Interaktionen erfolgte zum einen mittels Filter-Retentions-Assay. Dazu wurde eine konstante Menge (< 1 nM) an radioaktiv markierter ssDNA (4.1.6) mit steigenden Konzentrationen (0 nM – 1000 nM) an E-Selektin für 30 min bei RT inkubiert. Als Puffer diente dabei 1x PBS. Die benötigte Nitrozellulosemembran wurde zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 20 min in 0.4 M KOH gelegt. Die Membran wurde in eine 96-well-Dot Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll) eingespannt und unter Vakuum zweimal mit 200 μ l 1xPBS gewaschen. Die Reaktionsansätze wurden über die Nitrozellulosemembran filtriert. An das Protein bindende ssDNA-Moleküle wurden auf der Membran zurück gehalten. Nicht-bindende Nucleinsäuren wurden durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend getrocknet und konstante Mengen der jeweiligen Nucleinsäureproben (20% - Werte) zur Kontrolle aufgetragen. Die auf der Membran verbliebenen Mengen an radioaktiv markierten Nucleinsäuren wurden mittels Autoradiographie quantifiziert.

4.6.3 Stabilitätsassay

Zur Untersuchung der Stabilität von ssDNA in Medium erfolgte ein Stabilitätsassay. Dazu wurden jeweils 2 μ L der entsprechenden radioaktiv markierten ssDNA jeweils zu 118 μ L des entsprechenden Mediums bzw. Blutplasmas gegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C. Dabei wurden nach 0, 1, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8 und 24 h jeweils 10 μ L abgenommen und sofort mit 10 μ L 2x RNA-LD versetzt und mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben (nur 5 μ L) wurden dann auf ein 10 % denat. Gel aufgetragen. Die PAGE erfolgte bei 200 V für 10 min. Anschließend erfolgte die Detektion mittels Autoradiographie.

4.6.4 Sekundärstrukturvorhersage selektierter Aptamere

Die Sekundärstrukturanalysen der erhaltenen Aptamersequenzen wurden mit Hilfe des Programms *RNAstructure* (Version 5.7) von Mathews Lab (University of Rochester Medical Center) durchgeführt und die erhaltenen Strukturen gegebenenfalls untereinander verglichen.

4.6.5 Verkürzung von Aptameren anhand vorausgesagter Sekundärstrukturen

Basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen (4.6.4) wurde die Sequenz des Aptamers IDA verkürzt. Die entsprechende kurzen ssDNA wurden käuflich bei Sigma Aldrich erworben.

4.7 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Dabei erfolgte die Kultivierung der Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

4.7.1 Ablösung adhärenter Zellen

Zur Ablösung adhärenter Zellen wurden zunächst die Zellen zweimal mit 5 mL 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurde 1 mL Accutase hinzugefügt, zwei Minuten bei 37 °C inkubiert und die Zellen unter leichtem Klopfen gelöst.

4.7.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofectamin

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit mikroRNA wurden zunächst die Zellen in 24-well Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Opti-MEM[®] hinzugefügt. Das Lipofectamine 2000 Reagenz sowie 1 µg RNA wurden in 150 µL Opti-MEM[®] verdünnt und 1:1 gemischt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min bei RT und danach wurden 250 µL der Lösung zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 24 h weiterkultiviert, dann abgelöst und mittels Durchflusszytometrie (4.7.4) analysiert.

4.7.3 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden suspendierte Zellen an einem fokussierten Laser vorbeigeleitet, wobei sie in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Färbung charakteristische Lichtsignale aussenden, die mittels geeigneter Detektoren gemessen werden können. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten mit einem FACSCalibur System der Firma Becton Dickinson *Immunocytometry Systems*. Dabei besitzt das Gerät einen 488 nm Argon-Ionen Laser (FL-1, FL-2, FL-3), sowie einen 635 nm Rot-Dioden-Laser (FL-4).

4.7.4 Nachweis von Rezeptoren auf Zelloberflächen mittels Antikörpern

Der Nachweis von Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels Antikörpern erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurden 2×10^5 Zellen zunächst zweimal mittels Zentrifugation bei 400 x g für 2 Minuten bei 4 °C gewaschen und in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Daraufhin wurde 1 µl des entsprechenden primären Antikörpers hinzugegeben und die Zellen für 30 min

auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und 1 μL des sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde zweimal gewaschen und die Proben durchflusszytometrisch vermessen.

4.7.5 Analyse der Bindung von Nukleinsäuren an Zelloberflächen

Die Analyse der Bindung von Nukleinsäuren an Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dazu wurden die Zellen abgelöst (4.7.1), gezählt und jeweils 200.000 Zellen pro Probe eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit RPMI(-) bei 400 x g für 2 min, erfolgte die Inkubation der Nukleinsäuren für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und am BD FACSCalibur™ der Firma BD Biosciences.

4.7.6 Laser-Scanning Mikroskopie

Die Untersuchung der Internalisierung von Aptameren erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Dazu wurden zunächst PC-3-Zellen in einem Nunc™ *Glass Base Dish* bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und 20 min für 37 °C mit den jeweiligen Reagenzien inkubiert. Dabei wurden 100 nM Nukleinsäuren eingesetzt, 10 nM LysoTracker sowie Hoechst 33342 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Anschließend folgte eine Behandlung der Zellen mit 0.5 μL DNase I für 5 min bei 37 °C. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann am Olympus IX-81 Mikroskop vermessen.

4.7.7 Inhibitionsassay

Der Inhibitionsassay basiert auf der Detektion an Laminin gebundener Zellen. Zur Durchführung des Inhibitionsassays wurde zunächst 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin-332 in 50 μL RPMI in eine schwarze 96 well Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden gezählt, jeweils 150.000 aufgeteilt und gegebenenfalls mit den entsprechenden Nukleinsäuren (1.25 μM) bei RT für 30 min inkubiert. Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Aptamers ausgehend von 1.25 μM hergestellt und diese mit den Zellen inkubiert. Die Platte wurde zweimal mit 50 μL RPMI gewaschen und die jeweiligen Proben in 50 μL RPMI dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Anschließend wurde die Platte achtmal mit 1x PBS gewaschen. Die verbliebene Anzahl an Zellen wurde mittels CellTiter-Glo® Assay nach Angaben des Herstellers ermittelt.

5. Ergebnisse

5.1 Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für das $\alpha\beta4$ Integrin

Die Selektion von DNA-Aptameren für das $\alpha\beta4$ Integrin erfolgte durch Kombination zweier SELEX-Strategien. Die ersten fünf Selektionsrunden erfolgten mittels Zell-SELEX und die darauffolgenden sieben wurden mit konventioneller SELEX unter Verwendung des rekombinanten $\alpha\beta4$ Integrins immobilisiert auf magnetischen Partikeln durchgeführt. Eine schematische Darstellung beider SELEX-Verfahren ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.

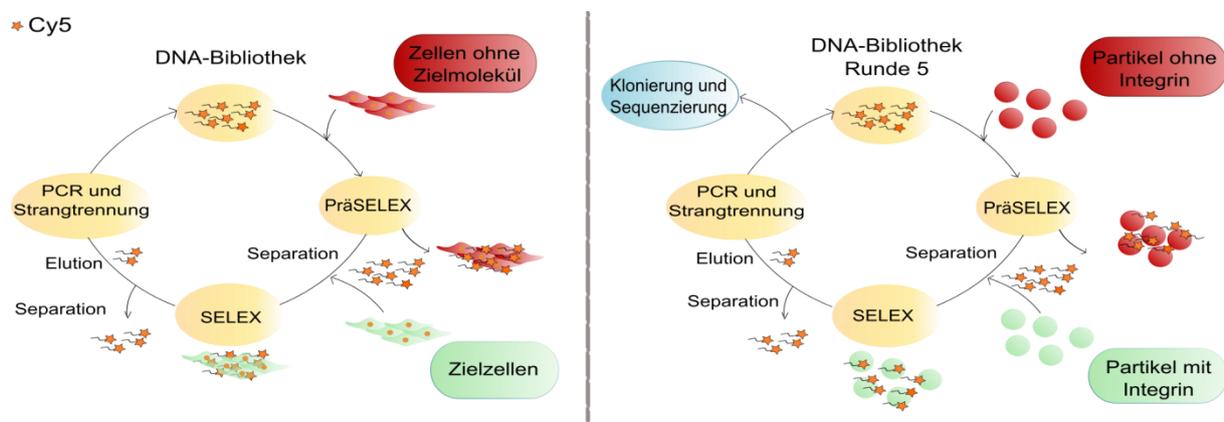


Abbildung 16: Schematische Darstellung der beiden verwendeten SELEX-Verfahren.

A) Zell-SELEX. Die mit Cy5-markierte ssDNA-Bibliothek wurde in den ersten beiden Selektionsrunden direkt in der SELEX eingesetzt. Dazu wurde die Bibliothek direkt mit den adhären PC-3-Zellen in einer Zellkulturschale inkubiert. Anschließend konnten ungebundene Nucleinsäuren direkt von den Zellen gewaschen werden. Die Elution gebundener Nucleinsäuren erfolgte durch Hitze; die Amplifikation mittels PCR und anschließender Strangtrennung. Die so erhaltenen einzelsträngigen DNAs konnten in der nächsten Runde eingesetzt werden. Ab Runde drei wurde zusätzlich eine PräSELEX mit PC-3- $\beta4$ -Integrin-Knockdown-Zellen durchgeführt. Dazu wurde die Bibliothek zuerst mit den Knockdown-Zellen inkubiert. Der Überstand dieser Inkubation wurde dann in der eigentlichen SELEX eingesetzt. B) Konventionelle SELEX unter Verwendung magnetischer Partikel. Ab Runde sechs erfolgte die Trennung bindender und nichtbindender Nucleinsäuren über magnetische Partikel. Diese präsentierten das rekombinante $\alpha\beta4$ Integrin auf ihrer Oberfläche. Zur PräSELEX wurden Partikel verwendet die kein Integrin präsentieren. Die Elution und Amplifikation war analog zur Zell-SELEX. Nach 12 Selektionsrunden erfolgten die Klonierung und die Sequenzierung erhaltener Klone.

Im ersten Schritt wurde mit der Startbibliothek, HPLC gereinigt bei Sigma Aldrich erworben, eine Zell-SELEX durchgeführt (Abbildung 16, A). Dies sollte zu einer Anreicherung von Nucleinsäuren führen, die die native Form des Integrins binden. Dabei wurden PC-3-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und dann mit der Bibliothek in SELEX-Puffer inkubiert. Nach dreifachem Waschen der adhären Zellen, erfolgte die Elution der gebundenen Nucleinsäuren mittels Hitze. Das gesamte Eluat wurde anschließend mit sieben PCR-Zyklen amplifiziert, um eine leichte Anreicherung der in der Bibliothek vorhandenen

Ergebnisse

Nukleinsäuren zu erreichen. Anschließend wurde die Anzahl der maximal benötigten PCR-Zyklen in einer Prä-PCR mit einem Fünftel des Eluates ermittelt. Dazu wurden jeweils nach drei PCR-Zyklen Proben entnommen und mittels nativer PAGE überprüft. Anschließend wurden mit dem Rest des Eluates die ermittelte Anzahl an PCR-Zyklen durchgeführt. Dies führte zu einer Erhöhung der maximalen Ausbeute sowie zur Verhinderung von Überamplifikaten, die während der SELEX ein häufiges Problem darstellen. Die erhaltenen dsDNAs wurden dann einer Strangtrennung unterzogen und die einzelsträngigen Nukleinsäuren in der zweiten SELEX-Runde eingesetzt. Um den Selektionsdruck zu erhöhen wurde daraufhin die Anzahl der Waschschrte auf vier erhöht.

In den ersten beiden SELEX-Runden wurden Nukleinsäuren selektiert, die an PC-3-Zellen binden. Um nun Nukleinsäuren zu erhalten, die das $\alpha 6\beta 4$ Integrin binden, wurden ab Runde drei PC-3- $\beta 4$ -Integrin-*Knockdown*-(ITGB4)-Zellen in einer Prä-SELEX eingesetzt (Abbildung 16, rote Zellen). Nukleinsäuren, die nicht an die $\beta 4$ -Untereinheit binden, sollten somit konsequent aus der Bibliothek entfernt werden. Zunächst erfolgte allerdings die Analyse des $\beta 4$ Integrin *Knockdowns* mittels Durchflusszytometrie. Dies sollte sicherstellen, dass kein Integrin auf der Zelloberfläche zu detektieren war. Dazu erfolgten die Inkubation der PC-3- $\beta 4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen mit dem primären Antikörper sowie die Fluoreszenzmarkierung des ersten AK mit einem FITC-markieren sekundären AK. Als Positivkontrolle dienten PC-3-Zellen, die das Integrin präsentierten, und als Negativkontrolle eine Isotypkontrolle. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse. Die Anzahl an PC-3-Zellen wurde gegen die Fluoreszenzintensität im FL-1-Kanal, zur Detektion des FITC-markierten sekundären Antikörpers, aufgetragen.

Ergebnisse

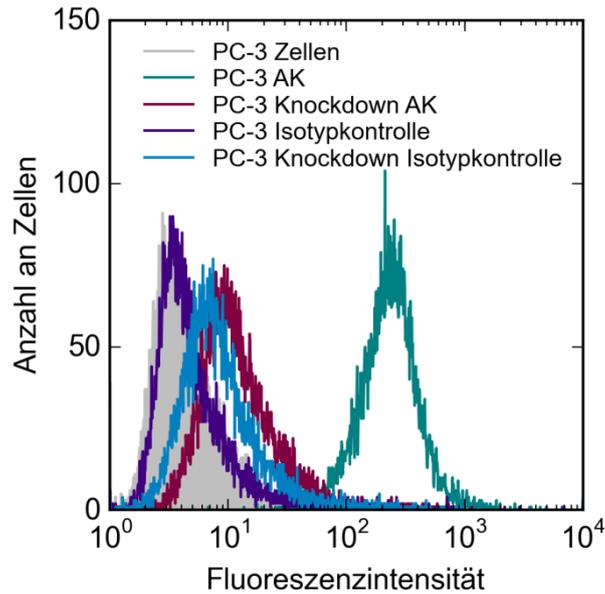


Abbildung 17: Analyse des *Knockdowns* des $\beta 4$ Integrins auf PC-3-Zellen. Grau: Eigenfluoreszenz der Zellen; grün: PC-3-Zellen mit Anti- $\beta 4$ -AK; blau und violett: Isotypkontrollen; rot: PC-3- $\beta 4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen mit Anti- $\beta 4$ -AK.

Die Analyse der Antikörperbindung zeigte, dass die *Knockdown*-Zellen im Gegensatz zu den PC-3-Zellen annähernd die gleiche Verschiebung aufwiesen wie die Isotypkontrolle. Dagegen wiesen die PC-3-Zellen eine hohe Bindung des $\beta 4$ Integrin-Antikörpers auf. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass der *Knockdown* des Integrins gewährleistet war.

Infolge dessen wurden diese Zellen weiter kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % mit der ssDNA aus Runde zwei inkubiert. Die so reduzierte Nukleinsäurebibliothek wurde dann in der eigentlichen SELEX eingesetzt. Die Waschschrte wurden wieder auf drei zurückgesetzt, da die Einführung der Prä-SELEX eine sehr stringente Maßnahme darstellte. Wie erwartet, führte dies in Runde drei zu einer starken Erhöhung der PCR-Zyklen von 12 bzw. 13 (Runde eins bzw. zwei) auf 29 zur Amplifikation der Bibliothek. Dies reduzierte sich ebenso stark wieder in Runde vier auf zwölf PCR-Zyklen. Trotz Erhöhung des Selektionsdruckes durch einen weiteren Waschschrte. Die durchgeführten PCR-Zyklen in Runde fünf waren mit elf minimal verringert.

Da diese Bibliothek jedoch auch immer noch eine Bindung an die PC-3- $\beta 4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen zeigte, wurde zur Erhöhung der Spezifität der Bibliothek die weitere Selektion mit dem rekombinanten $\alpha 6\beta 4$ Integrin, immobilisiert auf magnetischen Partikeln, durchgeführt. Die Immobilisierung des Integrins erfolgte über EDC/NHS Kopplung. Abbildung 18 zeigt schematisch die Kopplung.

Ergebnisse

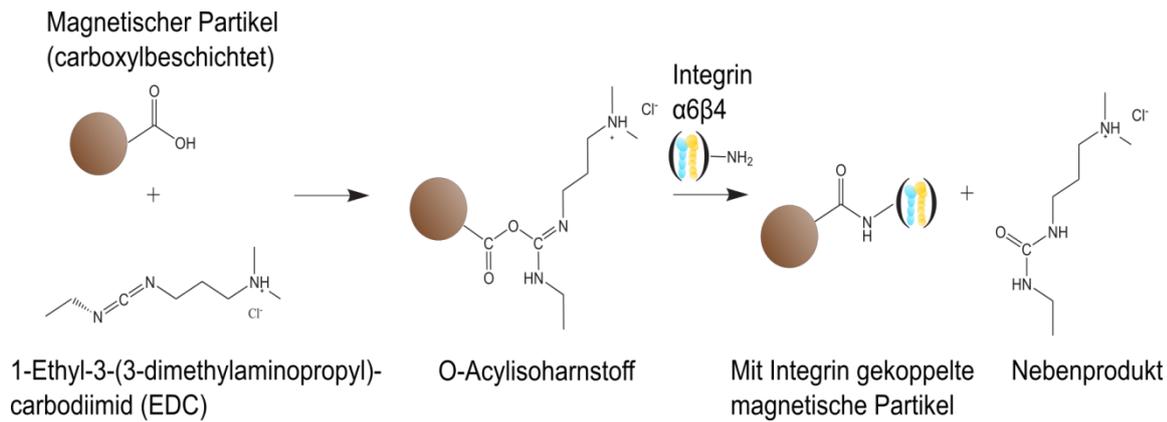


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Kopplung des Integrins an magnetische Partikel. Im ersten Schritt erfolgte die Aktivierung der Partikel mit EDC. Der entstandene reaktive *O*-Acylisoharnstoff reagierte dann mit einer der Aminogruppen des Integrins und es entstand eine kovalente Bindung. Das ebenfalls angefallene Nebenprodukt konnte dann über magnetische Separation abgetrennt werden.

Diese Änderung der SELEX-Strategie führte in Runde sechs wieder zu einem starken Verlust an bindenden Oligonukleotiden und somit zu einem Anstieg der PCR-Zyklen auf 27. Auch hier ergab sich mit 14 PCR-Zyklen wieder eine schnellere Amplifikation bindender Nukleinsäuren in der darauffolgenden SELEX-Runde. Durch die stetige Erhöhung der Waschschrte wurde der Selektionsdruck erhöht und es konnte in den folgenden Runden erst eine Verringerung und dann wieder eine Erhöhung der PCR-Zyklen beobachtet werden. Ab Runde zehn wurde die verwendete Proteinmenge halbiert. Trotzdem konnte eine Verringerung der PCR-Zyklen und somit ein Anreicherungseffekt beobachtet werden. In den letzten beiden Selektionsrunden wurde zusätzlich zur Konkurrenz und zur Anreicherung inhibierender Nukleinsäuren Laminin-332 hinzugefügt. Dies hatte keine negative Auswirkung auf die Anzahl durchgeführter PCR-Zyklen, da diese in Runde 12 weiter verringert werden konnten. Allerdings traten sogenannte Primer-Dimere auf. Dies sind Artefakte, die bei einer PCR entstehen können. Abbildung 19 zeigt das 10%ige native Gel nach Amplifikation des Eluates aus Runde 12.

Ergebnisse

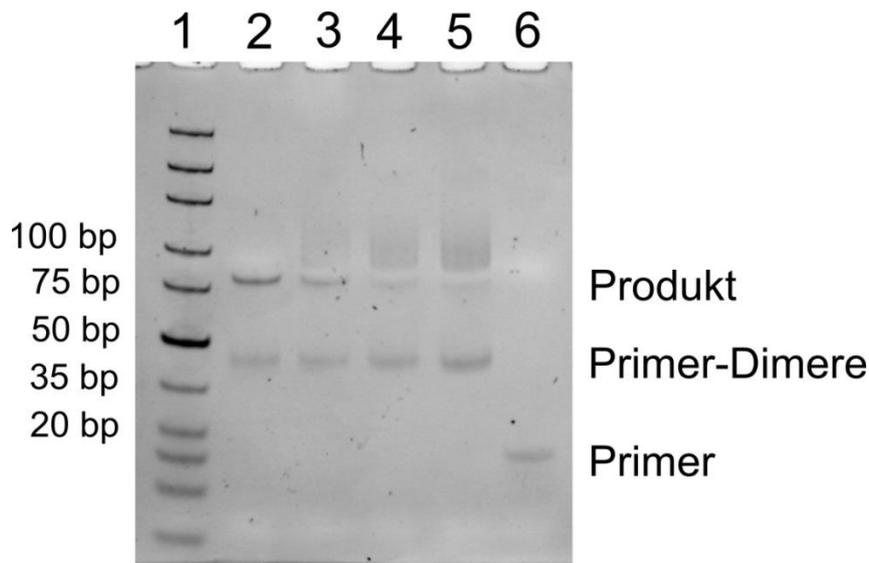


Abbildung 19: PCR zur Amplifikation der 12. SELEX-Runde. Aufgetragen wurden: Ultra Low Range DNA Ladder (1), PCR-Produkt nach 13 PCR-Zyklen (2), PCR-Produkt nach 16 PCR-Zyklen (3), PCR-Produkt nach 19 PCR-Zyklen (4), PCR-Produkt nach 22 PCR-Zyklen (5), Negativkontrolle ohne Templat (6).

Es zeigte sich eine Amplifikation bindender Nukleinsäuren nach 13 PCR-Zyklen mit einer Bandenhöhe der erwarteten 80 bp (Spur 2). Nach weiteren PCR-Zyklen entstanden allerdings immer mehr Überamplifikate und die eigentliche Produktbande wurde schwächer (Spur 3-5). Allerdings waren in allen Produkts Spuren sogenannte Primer-Dimere bei 40 bp zu sehen. Die Negativkontrolle zeigte kein PCR-Produkt, sondern nur die erwartete Primerbande bei 20 bp. Eine genaue Auflistung der in der SELEX angewendeten Bedingungen ist noch einmal zusammenfassend Tabelle 17 zu entnehmen.

Nach der 12. Selektionsrunde wurde die SELEX beendet und die erhaltenen Bibliotheken auf ihre Bindung an PC-3-Zellen untersucht.

Ergebnisse

Tabelle 17: Übersicht über die Bedingungen während der einzelnen SELEX-Runden sowie die Anzahl sich ergebender PCR-Zyklen. Das x zeigt eine Verwendung, das – keine Verwendung in der jeweiligen SELEX-Runde.

Runde	Waschschritte	PC-3-Zellen	PC-3-β4-Integrin-Knockdown-Zellen	α6β4 Integrin (pmol)	Laminin	PCR Zyklen
1	3 x 500 µL	x	-	-	-	12
2	4 x 500 µL	x	-	-	-	13
3	4 x 500 µL	x	x	-	-	29
4	5 x 500 µL	x	x	-	-	12
5	6 x 500 µL	x	x	-	-	11
6	1 x 500 µL	-	-	100	-	27
7	3 x 500 µL	-	-	100	-	14
8	5 x 500 µL	-	-	100	-	12
9	7 x 500 µL	-	-	100	-	18
10	9 x 500 µL	-	-	50	-	16
11	3 x 500 µL	-	-	50	x	16
12	5 x 500 µL	-	-	50	x	12

5.2 Analyse der Bindung der angereicherten Bibliothek an PC-3-Zellen

Die Analyse der Bindung der Bibliotheken der Runden 0, 6, 10 und 12 erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es wurden die jeweiligen Runden ausgewählt, in denen eine Änderung der SELEX-Bedingungen vorlag. Die Runde 0 diente als Negativkontrolle. In einer durchflusszytometrischen Analyse wird die bindende Spezies mittels Fluoreszenz detektiert. Aufgrund dessen erfolgte zunächst die Fluoreszenzmarkierung der Bibliotheken durch Verwendung eines 5'Cy5-markierten Vorwärtsprimers, der während der PCR eingebaut

Ergebnisse

wurde. Abbildung 20 zeigt eine Überlagerung der Cy5-Fluoreszenz (rot) mit den mit Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren (grün).

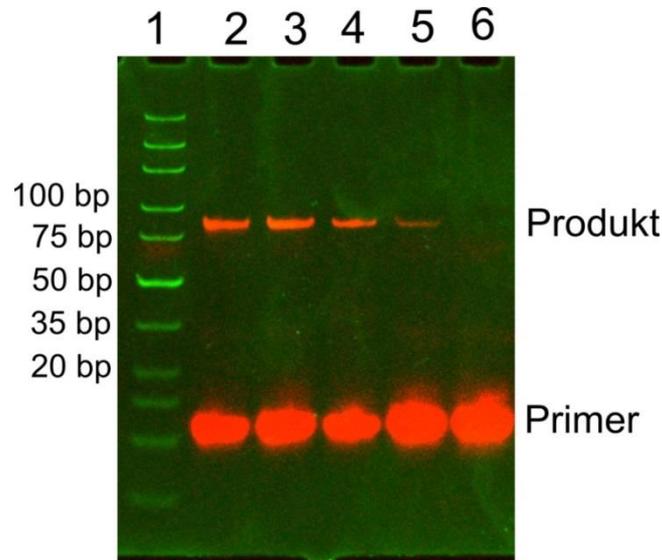


Abbildung 20: Analyse der PCR zur Fluoreszenzmarkierung der Bibliotheken. Die Banden entsprechen dem Ultra Low Range DNA Ladder (1), dem PCR-Produkt Bibliothek R0 (2), dem PCR-Produkt Bibliothek R6 (3), dem PCR-Produkt Bibliothek R10 (4), dem PCR-Produkt Bibliothek R12 (5) und der Negativkontrolle ohne Templat (6).

Es konnte bei allen Nukleinsäure-Bibliotheken eine Bande mit einer Länge von 80 Basenpaaren detektiert werden. Dabei zeigten die Bibliotheken R0 und R6 eine höhere Fluoreszenzintensität als die anderen beiden PCR-Produkte. Am schwächsten war die Bande der Bibliothek R12 (Spur 5). Dies könnte ein Zeichen für hochstrukturierte Nukleinsäuren sein, da diese in einer PCR schlechter amplifiziert werden. Die Negativkontrolle zeigt nur die Bande des Cy5- markierten Vorwärtsprimers (Spur 6). Somit konnte eine Kontamination der Reagenzien ausgeschlossen werden. Es folgte eine Strangtrennung, die Inkubation der Einzelstränge mit PC-3-Zellen und die durchflusszytometrische Analyse. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Bindungsanalyse; aufgetragen wurde die Anzahl an Zellcounts gegen die Fluoreszenzintensität im FL-4-Kanal, der für eine Cyanine5-Detektion benötigt wurde.

Ergebnisse

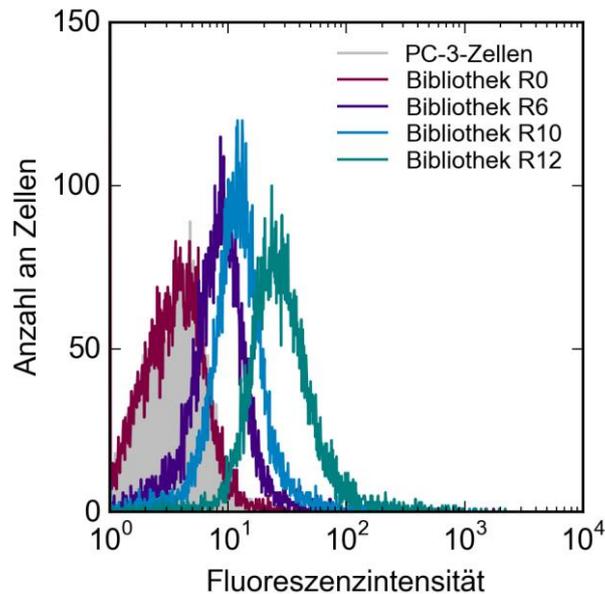


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der Bibliotheken aus R0 (rot), R6 (blau), R10 (lila) und R12 (grün) an PC-3-Zellen. Eine Anreicherung bindender Spezies in den höheren Selektionsrunden ist zu erkennen. (Eigenfluoreszenz: grau)

Die durchflusszytometrische Analyse der Bibliotheken der Runden 0 (rot), 6 (blau), 10 (violett) und 12 (grün) zeigte eine Verschiebung der Signale hin zu höherer Fluoreszenzintensität und somit eine deutliche Anreicherung der Bindung mit steigender Rundenzahl. Dabei zeigte die Startbibliothek (rot) keine Bindung an die Zellen. Dies entspricht auch der Verschiebung der unbehandelten PC-3-Zellen (grau). Es folgt eine langsame Erhöhung der Bindung in R 6 und R10. Die Bibliothek in Runde 12 zeigte die höchste Fluoreszenzverschiebung und lässt auf eine Anreicherung von bindenden DNA-Molekülen schließen.

Zur Analyse der Spezifität wurden diese Bibliotheken mit PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen inkubiert. Abbildung 22 zeigt den darauffolgenden durchflusszytometrischen Bindungsnachweis. Die Durchführung erfolgte analog zur Analyse mit PC-3-Zellen.

Ergebnisse

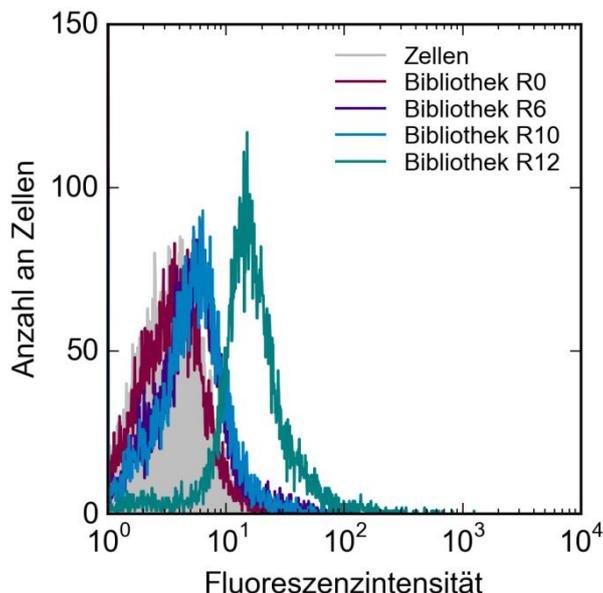


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bindungs-Analyse. Getestet wurden die Bibliotheken aus R 0 (rot), 6 (lila), 10 (blau) und 12 (grün) an PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen. Eine Anreicherung bindender Spezies ist nur in der Bibliothek aus Runde 12 zu erkennen.

Die Ausgangsbibliothek zeigte keine Bindung an die Zellen (rot). Die Bibliotheken der Runden 6 und 10 zeigen eine leichte Fluoreszenzerhöhung (blau, lila). Lediglich die Bibliothek aus Runde 12 zeigte eine stärkere Verschiebung (grün). Diese deutliche Erhöhung der gemittelten Fluoreszenzerhöhung von Runde 10 auf Runde 12 bei den PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen zeigt eine Anreicherung nicht- β 4 Integrin-bindender Spezies. Somit hat die Bindung an die Zellen zwar zugenommen - es geschah aber auf Kosten der Spezifität. Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgte die Vereinzelung der Bibliotheken sowohl aus Runde zehn als auch aus Runde zwölf mittels Klonierung.

5.3 Klonierung und Sequenzierung der Bibliotheken der Runden 10 und 12

Zur Klonierung der Bibliotheken der Runden 10 und 12 wurden diese zunächst in einer PCR um die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Eco RI und HindIII verlängert. Im Anschluss wurden sowohl das Plasmid pUC19 als auch die resultierenden PCR-Produkte mit diesen Enzymen restringiert. Nach Reinigung des Plasmids erfolgte die Ligation beider restringierter Produkte sowie die Transformation von *E. coli* Top 10 mittels Elektroporation. Positive Klone wurden mittels Blau-Weiß-Screening identifiziert und zur Verifizierung einer Kolonie-PCR unterzogen. Letztendlich konnten 20 positive Klone identifiziert und mittels Sanger-

Ergebnisse

Sequenzierung durch die Firma GATC sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen. Zur Unterscheidung der jeweiligen Ursprünge der Sequenzen, wurde die jeweilige Runden-Nummer dem Namen jeweils vorangestellt (z.B. Integrin 1218 entspricht Sequenz 18 der Runde 12).

Die Sequenzierung der aus den Klonen erhaltenen DNA zeigte keine Anreicherung bestimmter Sequenzen. Lediglich die Nukleinsäuren (nc) 1210/1211 waren identisch. Alle anderen Sequenzen traten nur einmal auf. Die Verwandtschaft der Sequenzen wurde mit dem Programm *Megalign* untersucht. Dabei wurden die Kernregionen mit der *Clustal*-Methode verglichen und zur besseren Übersicht ein Stammbaum erstellt (Abbildung 23).

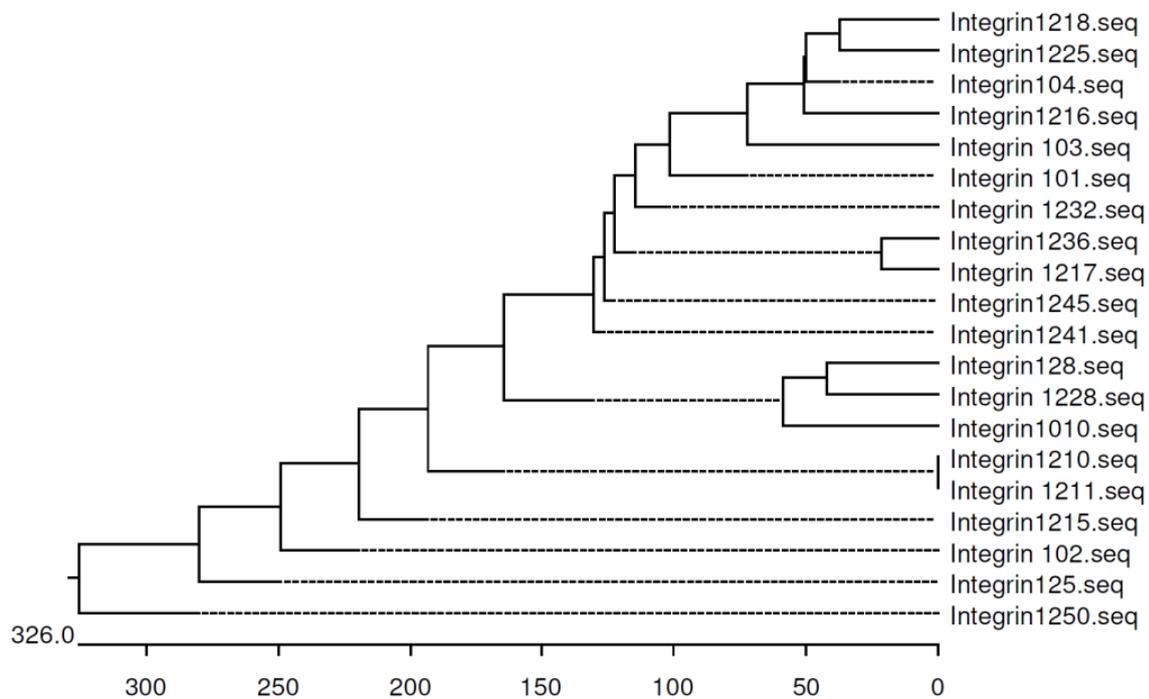


Abbildung 23: Phylogenetischer Stammbau der sequenzierten Nukleinsäuren der Runden 10 und 12. Die Kernregion der jeweiligen Nukleinsäuren wurden mittels der *Clustal*-Methode durch das Programm *Megalign* verglichen. Es zeigte sich keine direkte Verwandtschaft der Nukleinsäuren.

In dem erstellten Baum ist keine direkte Verwandtschaft der erhaltenen Sequenzen zu erkennen. Um dennoch die Anzahl an Nukleinsäuren für spätere Bindungsstudien einzugrenzen, erfolgte eine weitere Analyse der Sequenzen mittels des Webservers *MEME Suite*.⁸⁸ Dieses Programm erkennt vorhandene Motive in DNA, RNA oder Proteinsequenzen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die acht erkannten Motive. Unterschiede der entsprechenden Nukleotide sind durch Doppelbuchstaben gekennzeichnet.

Tabelle 18: Struktur motive der erhaltenen Sequenzen. Die Analyse erfolgte mittels *MEME Suite*.⁸⁸ Die Kennzeichnung nicht gleicher Nukleotide erfolgte durch Doppelbuchstaben.

	Motiv	Nukleinsäuren
1	CCTG _C TCAT _A TGT _C TT	1225, 1010
2	ACATTA	1250, 1215
3	TGCC _A ATGTA	1250, 1226
4	TGCT _G TT _A TGT	125, 1217
5	TG _A CT _A ACTGC	1010, 1216
6	TATCGT	1225, 125
7	TAT _C AT	128, 1215
8	A _A TCCCACG	1236, 1217

Die Ergebnisse der Motivsuche zeigen, dass vor allem die nc1010 (Motiv 1 und 5), 1225 (Motiv 1 und 6) und 1250 (Motiv 2 und 3) gute Kandidaten für eine Bindungsanalyse sind. Die Motive 4, 5, 6, 7, 8 wurden in den Bindungsanalysen jeweils durch die in der Tabelle 18 vorangestellte Nukleinsäure abgedeckt. Allerdings konnte so die Anzahl an zu analysierenden Nukleinsäuren nur zu einem geringen Anteil reduziert werden (nc1215,1216).

5.4 Charakterisierung bindender Nukleinsäuren

5.4.1 Analyse zur Identifizierung bindender Nukleinsäuren

Die verbliebenen 18 Klone wurden alle durchflusszytometrisch auf ihre Affinität zu den PC-3-Zellen untersucht. Die Durchführung und Analyse erfolgte analog Kapitel 5.2. Abbildung 24 zeigt die Fluoreszenzverschiebung dieser Nukleinsäuren.

Ergebnisse

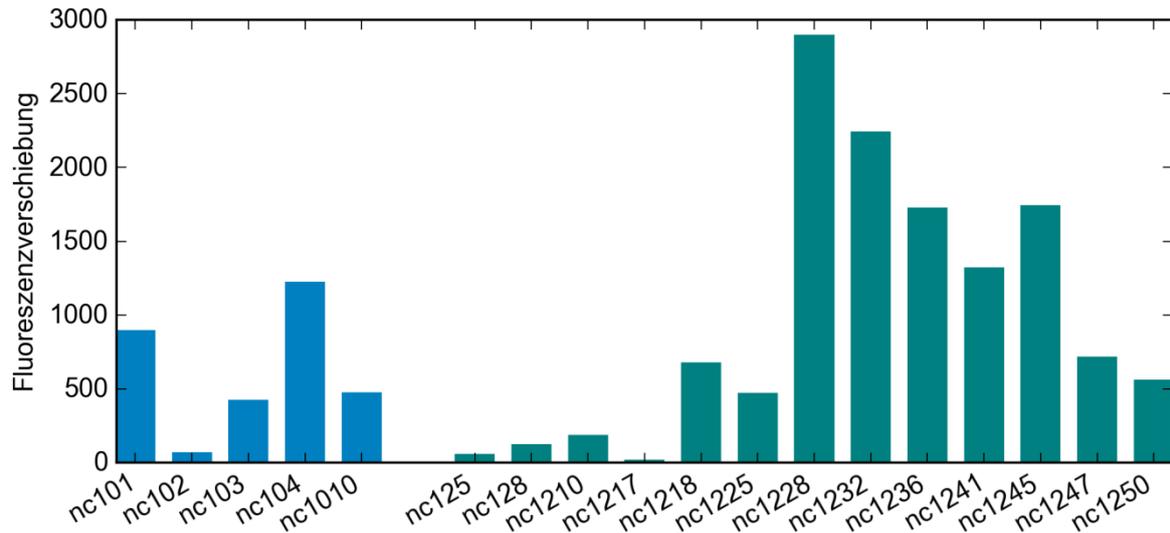


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bindungs-Analyse der Nukleinsäuren aus den Runden 10 (blau) und 12 (grün). Dabei zeigte nc1228 die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von 1232 und 1236. Insgesamt binden die Nukleinsäuren aus Runde 12 mit einer höheren Affinität. Die höchste Bindung in Runde 10 zeigte die nc104. Lediglich die Moleküle nc102, nc125, nc128, nc1210 und nc1217 banden nicht an die PC-3-Zellen.

Die Analyse der Bindungsstudien zeigte, dass die Nukleinsäuren aus Runde 10 nicht so affin an die PC-3-Zellen gebunden hatten, wie die aus Runde 12. Dabei hatten die Nukleinsäuren nc1228, nc1232 und nc1236 am besten an die PC-3-Zellen gebunden. In Runde 10 zeigte die nc104 die stärkste Bindung. Nur fünf der 18 Nukleinsäuren interagierten nicht mit den PC-3-Zellen. Von diesen Ergebnissen ausgehend, sollte nun eine mögliche Inhibition der Integrin-Laminin-Interaktion durch die Nukleinsäuren untersucht werden.

5.4.2 Verdrängung des $\beta 4$ Integrin Antikörpers durch Nukleinsäuren

Um feststellen zu können, ob eine der Nukleinsäuren affiner an die gleiche Bindungsstelle bindet, als der inhibierende $\beta 4$ -Integrin-spezifische Antikörper, wurde dessen Verdrängung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde ein Überschuss an Nukleinsäuren gegenüber dem Antikörper eingesetzt. Die Anzahl an PC-3-Zellen wurde gegen die Fluoreszenzintensität im FL-1-Kanal, zur Detektion des FITC-markierten sekundären Antikörpers, aufgetragen (Abb. 25).

Ergebnisse

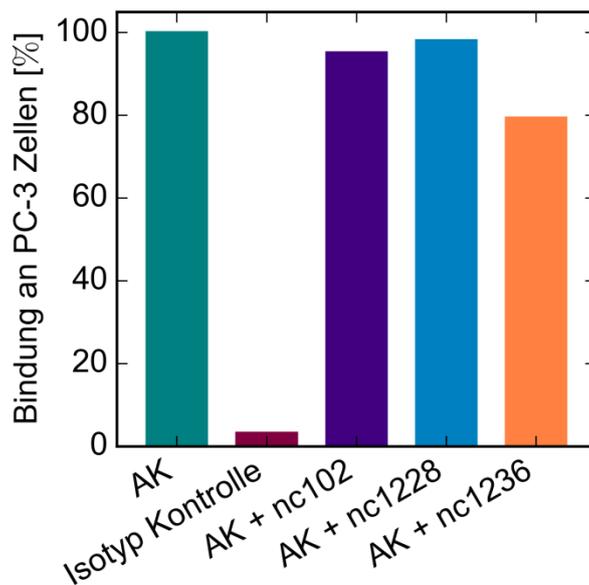


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperverdrängung durch Nukleinsäuren. Es zeigte sich kein signifikanter Rückgang der Antikörperbindung (Anti- β 4-AK, ASC-8; grün) nach Zugabe der Nukleinsäuren nc102 (violett), nc1228 (blau) und nc1236 (orange); Isotypkontrolle (rot).

Es ist zu erkennen, dass keine der Nukleinsäuren zu einem signifikanten Rückgang der Antikörperbindung führte und Nukleinsäuren und Antikörper folglich nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Lediglich die nc1236 zeigte einen Rückgang der Antikörperbindung um 20% (orange). Für alle anderen Nukleinsäuren konnte kein signifikanter Rückgang der Antikörperfluoreszenz detektiert und somit auch keine Verdrängung beobachtet werden. Der FITC-markierte sekundäre Antikörper als Isotypkontrolle zeigte wie erwartet keine Verschiebung (rot).

Neben der Nukleinsäure mit der stärksten Bindung (nc1228) wurde nun auch die nc1236 in dem nachfolgenden Assay auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Integrin-Laminin-Bindung überprüft.

5.4.3 Inhibition der Bindung von PC-3-Zellen an Laminin-332

Es wurde nun untersucht, ob die nc1228 und nc1236 in der Lage waren, die Bindung von PC-3-Zellen an Laminin-332 zu inhibieren.

Ergebnisse

Dazu wurden PC-3-Zellen, die entweder mit den Nukleinsäuren inkubiert wurden oder unbehandelt waren, in eine mit Laminin-332 beschichtete Platte gegeben. Nach Inkubation der Zellen mit dem Laminin wurden ungebundene Zellen von der Platte gewaschen und die Anzahl bindender Zellen mittels CellTiter-Glo[®] Assay bestimmt. Als Negativkontrolle dienten LnCap-Zellen, die kein $\alpha 6\beta 4$ Integrin präsentieren. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung normiert auf die unbehandelten PC-3-Zellen als 100%.

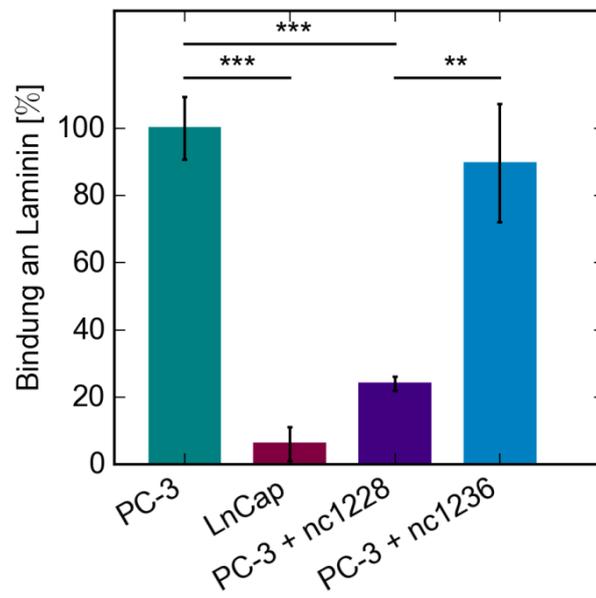


Abbildung 26: Analyse der Inhibition der nc1228 (violett) und nc1236 (blau). Auftragung einer Dreifachbestimmung. Die Bindung der PC-3-Zellen an Laminin-332 wurde nur durch die nc1228 inhibiert (violett). Die nc1236 (blau) zeigte lediglich eine sehr geringe Verringerung der Bindung gegenüber unbehandelten Zellen (grün). Integrin-negative LnCap-Zellen (rot) zeigten keine Bindung an Laminin.

Es ist zu erkennen, dass die Nukleinsäure 1228 (violett) die Bindung der PC-3 Zellen an Laminin-332 inhibierte und zwar signifikant mit einem P-Wert < 0.001 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (grün) sowie < 0.05 im Vergleich zur nc1236 (blau). Integrin-negative LnCap-Zellen banden ebenfalls nicht an Laminin-332 (rot). Der P-Wert im Vergleich zu unbehandelten PC-3-Zellen betrug ebenfalls < 0.001 . Zur Bestimmung der Inhibitionskonstante wurde eine Verdünnungsreihe der nc1228 mit konstanten Zellmengen inkubiert und anschließend zum Laminin gegeben. Bindende PC-3-Zellen konnten nach dem Waschen wieder detektiert werden. Abbildung 27 zeigt die Auftragung der prozentualen Bindung der PC-3-Zellen in Abhängigkeit von der Nukleinsäurekonzentration.

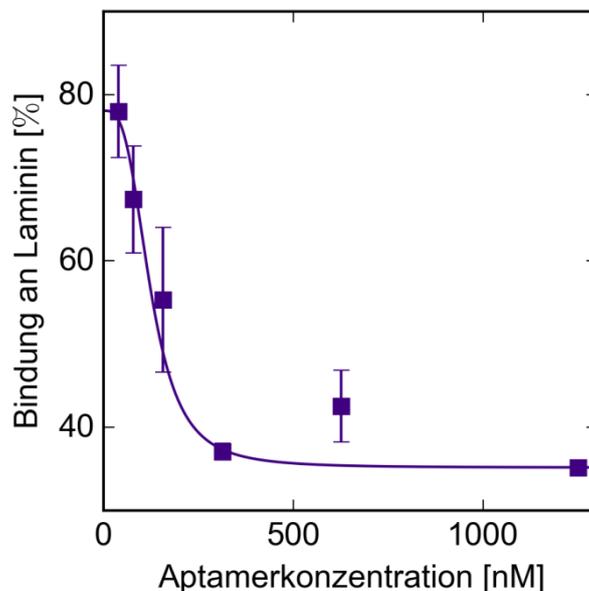


Abbildung 27: Inhibitionsassay zur Bestimmung der Inhibitionskonstante von nc1228. Auftragung der prozentualen Bindung gegen die Nukleinsäurekonzentration. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung.

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i wurde ein Hill-Fit verwendet. Aus der aufgetragenen Kurve ergab sich ein K_i von 123 ± 44 nM. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) lag bei ~ 150 nM. Im Folgenden wird die Nukleinsäure 1228 nun als Integrin spezifisches DNA-Aptamer (IDA) bezeichnet. Um festzustellen, ob das Aptamer tatsächlich aufgrund seiner Affinität und Spezifität zum $\alpha 6\beta 4$ Integrin inhibiert, erfolgte die weitere Charakterisierung über durchflusszytometrische Analysen und *electrophoretic mobility shift assays*.

5.5 Weitere Charakterisierung von IDA

5.5.1 Bestimmung der Affinität von IDA an PC-3-Zellen

Die Bestimmung der Affinität erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Cy5-markierten Aptamer hergestellt und diese mit konstanten Mengen der PC-3-Zellen inkubiert. Die Proben wurden gewaschen und die Bindung der Reihe an die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrolle diente eine Verdünnungsreihe einer nichtbindenden Kontroll-DNA. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Auftragung der prozentualen Bindung gegen die Nukleinsäurekonzentration. Alle Werte wurden normiert auf die Bindung der höchsten IDA-Konzentration als 100%.

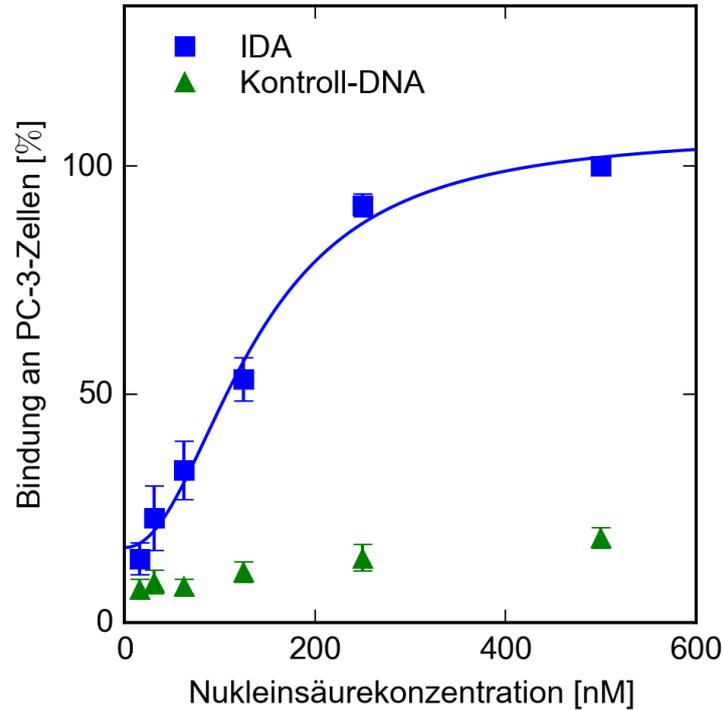


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Affinität von IDA (blau) an PC-3 Zellen. Die nichtbindende Kontroll-DNA (grün) zeigt nur eine geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei hohen Konzentrationen. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Doppelbestimmung.

Für die Bindung des Aptamers an PC-3-Zellen konnte eine Dissoziationskonstante K_d von 137 ± 22 nM ermittelt werden. Die Kontroll-DNA zeigt nur einen geringen Anstieg gebundener Nucleinsäuren bei hohen Konzentrationen. Somit konnte die Affinität von IDA nachgewiesen werden.

5.5.2 Bestimmung der Spezifität von IDA

Zur Analyse der Spezifität wurde die Bindung von IDA an PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 29 zeigt die Bindung des Aptamers an PC-3-Zellen im Vergleich zu den PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen.

Ergebnisse

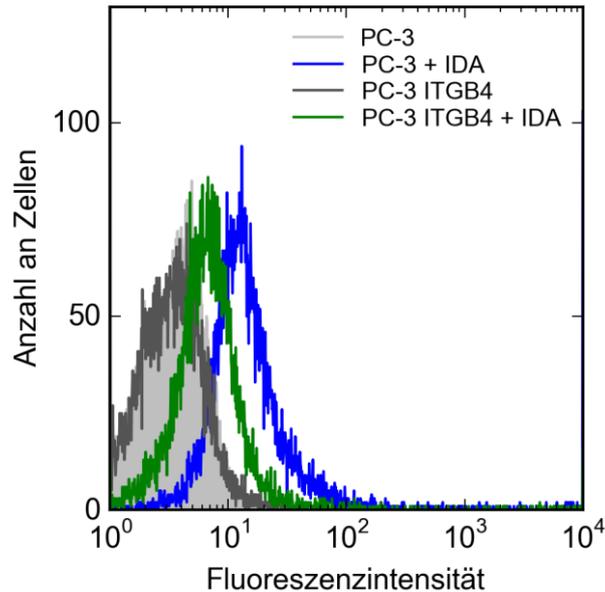


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der Spezifität von IDA. Das Aptamer bindet stärker an PC-3-Zellen (blau) als PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen (grün). Die Eigenfluoreszenz der Zellen ist in grau dargestellt.

Die Fluoreszenzverschiebung von IDA ist bei den PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen (grün) um 50% geringer als bei den β 4-Integrin-präsentierenden PC-3-Zellen (blau). Somit zeigt IDA, nicht wie erwartet, einen vollständigen Rückgang der Bindung, sondern eine um 50% reduzierte Bindung an PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen. Die Eigenfluoreszenz der beiden Zelllinien ist jedoch identisch (hell und dunkelgrau). Dies weist darauf hin, dass IDA neben dem β 4 Integrin auch noch an andere Proteine auf der Zelloberfläche binden kann. Dies könnte z.B. das α 6 β 1 Integrin sein, das die gleiche α -Untereinheit besitzt.

Um diese Hypothese nachzuweisen, sollte die Spezifität des Aptamers über die Bindungsanalyse mit den rekombinanten Proteinen näher verifiziert werden. Hierzu wurden neben dem humanen α 6 β 4 auch noch das α 6 β 1 Integrin ausgewählt, um zu sehen an welche der beiden Untereinheiten (α 6 oder β 4) das Aptamer bindet. Als Negativkontrolle diente das α 4 β 1 Integrin, ein VCAM-1 bindendes Integrin. Zusätzlich wurde auch die Bindung des Aptamers an das murine α 6 β 4 untersucht. Die Analyse der Bindung erfolgte radioaktiv mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Hierzu wurden die Proteine mit radioaktiv markiertem IDA inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch untersucht. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Signalintensitäten einer Doppelbestimmung zu sehen.

Ergebnisse

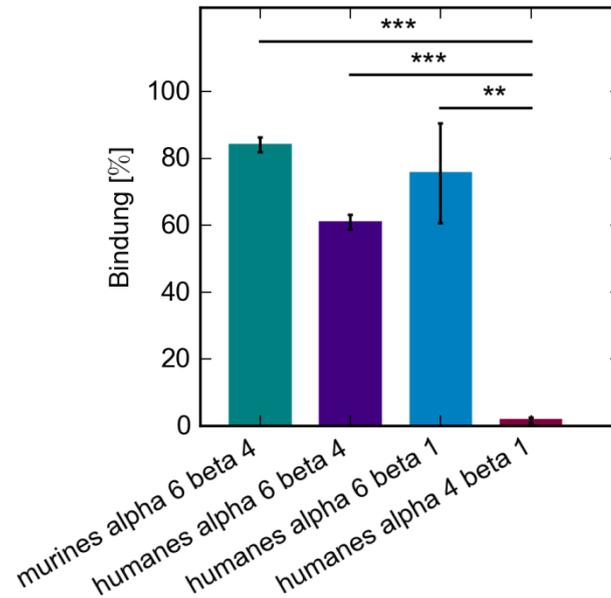


Abbildung 30: EMSA zur Analyse der Spezifität von IDA. Es konnte eine Bindung des Aptamers sowohl an das humane (violett) als auch an das murine $\alpha 6\beta 4$ Integrin (grün) gezeigt werden. Im Gegensatz zum $\alpha 4\beta 1$ (rot) war allerdings auch eine Bindung ans $\alpha 6\beta 1$ Integrin (blau) zu beobachten. Dies deutete auf eine Spezifität zur $\alpha 6$ Integrin-Untereinheit hin.

Es zeigte sich eine Bindung von IDA sowohl an das humane $\alpha 6\beta 4$ ($61\% \pm 2$) als auch an das $\alpha 6\beta 1$ Integrin ($76\% \pm 15$), jedoch nicht an das $\alpha 4\beta 1$ ($2\% \pm 1$). Das ließ auf eine deutliche Spezifität des Aptamers für die $\alpha 6$ Integrin-Untereinheit schließen. Die Signifikanz der Ergebnisse ergab sich durch einen P-Wert von < 0.001 des humanen $\alpha 6\beta 4$ Integrins im Vergleich zum $\alpha 4\beta 1$, sowie für das $\alpha 6\beta 1$ Integrin von < 0.01 . IDA bindet zusätzlich zum humanen Integrin auch an das murine $\alpha 6\beta 4$ Integrin mit $84\% \pm 2$. Neben den Integrinen wurden noch weitere Proteine auf ihre Aptamerbindung überprüft. Es wurden Adhäsionsproteine wie ICAM-1, CD24 und E-Selektin, sowie der Blutgerinnungsfaktor Thrombin, Streptavidin, das Zytokin Interleukin-6 und Lysozym untersucht. Die Abbildung 31 zeigt das Ergebnis des *electrophoretic mobility shift assays*.

Ergebnisse

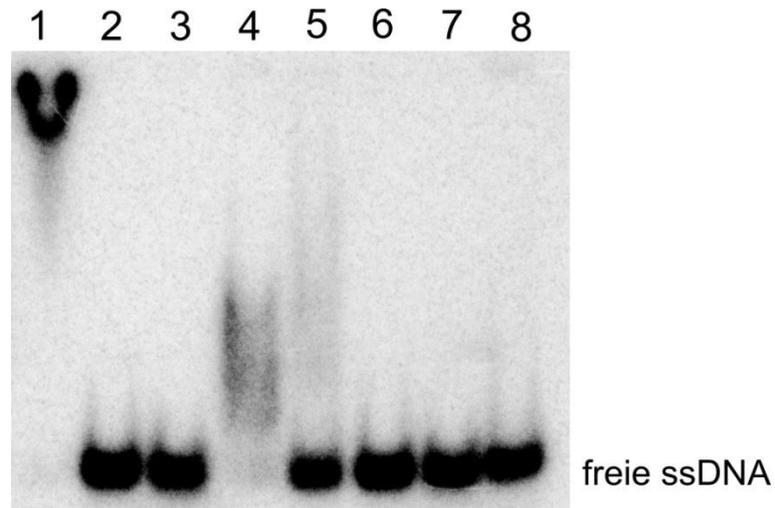


Abbildung 31: EMSA zur weiteren Analyse der Spezifität von IDA. Mit Ausnahme des E-Selektins (Spur 4) konnte keine Bindung des Aptamers an andere Proteine als das $\alpha 6\beta 1$ Integrin (Spur 1) nachgewiesen werden. Die Spuren enthalten das $\alpha 6\beta 1$ Integrin (1), ICAM-1 (2), CD24 (3), E-Selektin (4), Thrombin (5), Streptavidin (6), IL-6 (7) sowie Lysozym (8).

Abbildung 31 zeigt ebenfalls die Spezifität des Aptamers für das Integrine (Spur 1). Lediglich für das E-Selektin konnte ein Shift der radioaktiven Nukleinsäuren detektiert werden und somit eine transiente Bindung an das Aptamer (Spur 4). Die anderen Proteine zeigten keine Veränderung der Mobilität des Aptamers.

Um zu testen, ob die Primerregionen für die unspezifische Bindung an das E-Selektin verantwortlich sind, erfolgte ein Filter-Retentions-Assay mit dem Aptamer sowie mit um die Primersequenzen verkürzten Varianten. Als Positivkontrolle diente das E-Selektin-Aptamer SDA2,⁸⁹ das dieselben Primerregionen besaß und als Negativkontrolle eine nichtbindende Kontroll-DNA. Diese besaß ebenfalls identische Primerbereiche.

Ergebnisse

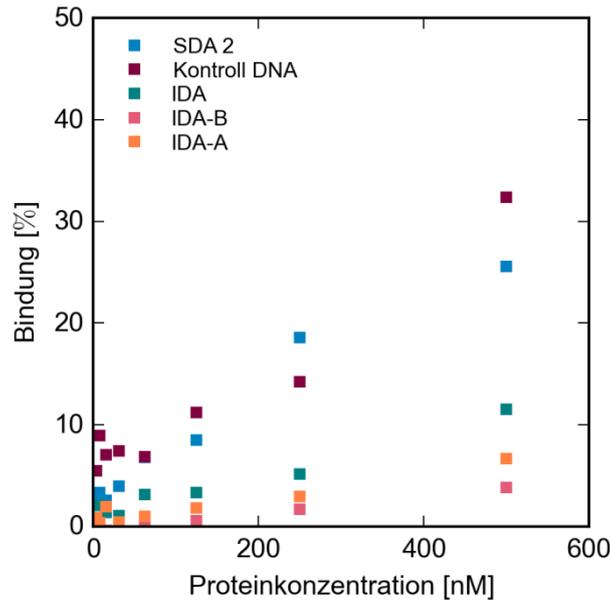


Abbildung 32: Filter-Retentions-Assay zur Analyse der Bindung von IDA an E-Selektin. Es binden sowohl die Kontroll-DNA (rot) als auch das E-Selektin Aptamer SDA2 (blau). IDA-B, das keinen der beiden Primerbereiche besitzt bindet am schwächsten an E-Selektin (pink, Länge 36 nt). Mit einem Teil des reversen Primers (IDA-B, orange; 44 nt) steigt die Bindung. IDA (grün, 77 nt) bindet bei 500 nM zu 10%.

Sowohl das Selektin-Aptamer SDA 2 (blau) als auch die Kontroll-DNA (rot), die beide dieselben Primerregionen besitzen, banden an E-Selektin. IDA (grün) zeigt im Gegensatz eine niedrigere eine geringere Bindung an das Selektin als beide Kontrollen. Diese verringerte sich noch bei Entfernen eines (orange) oder beider Primerbereiche (pink). Entweder die unspezifische Bindung erfolgte durch die Primer oder die Länge der Nukleinsäuren war ausschlaggebend. Schließlich sank die Bindung mit Abnahme der Anzahl an Nukleotiden.

5.5.3 Internalisierung von IDA in PC-3-Zellen

Zusätzlich zur Spezifität wurde untersucht, ob IDA in der Lage war, mit dem Integrin zusammen in die Zellen internalisiert zu werden. Dies erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Dazu wurden die PC-3-Zellen in speziell für die Mikroskopie geeigneten Zellkulturschalen kultiviert. Somit konnten die Zellen direkt in ihrer adhären Form untersucht werden. Um festzustellen, ob das $\alpha 6\beta 4$ Integrin tatsächlich internalisiert wurde, wurde zunächst diese Internalisierung mit einem $\beta 4$ Integrin-spezifischen Antikörper untersucht. Dabei erfolgte zunächst die Inkubation mit dem primären Antikörper auf Eis für 30 Minuten und eine zweite Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der FITC-markiert

Ergebnisse

war, ebenfalls auf Eis. Anschließend konnte die Bindung an die PC-3-Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt.

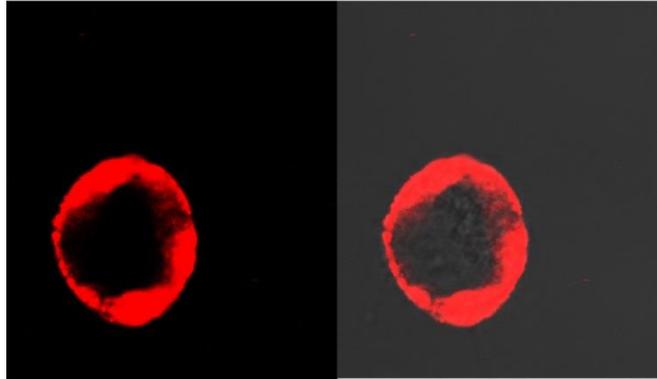


Abbildung 33: Bindung des $\beta 4$ Integrin-Antikörpers an PC-3-Zellen, aufgenommen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Eine komplette Färbung der Oberfläche der Zelle ist zu sehen. Links: reiner Fluoreszenzkanal (650 nm), rechts: Überlagerung der Fluoreszenz mit dem Durchlicht.

Es konnte eine komplette Färbung der Oberfläche der PC-3-Zelle beobachtet werden. Dies entsprach den Erwartungen, dass bei 4 °C keine Internalisierungs-Prozesse stattfinden bzw. diese nur sehr langsam ablaufen. Nachdem nun eine Bindung des Antikörpers bei 4°C zu sehen war, wurde die Internalisierung durch die Inkubation derselben Zellen bei 37°C eingeleitet. Nach 20 Minuten erfolgte eine weitere Aufnahme (Abbildung 34).

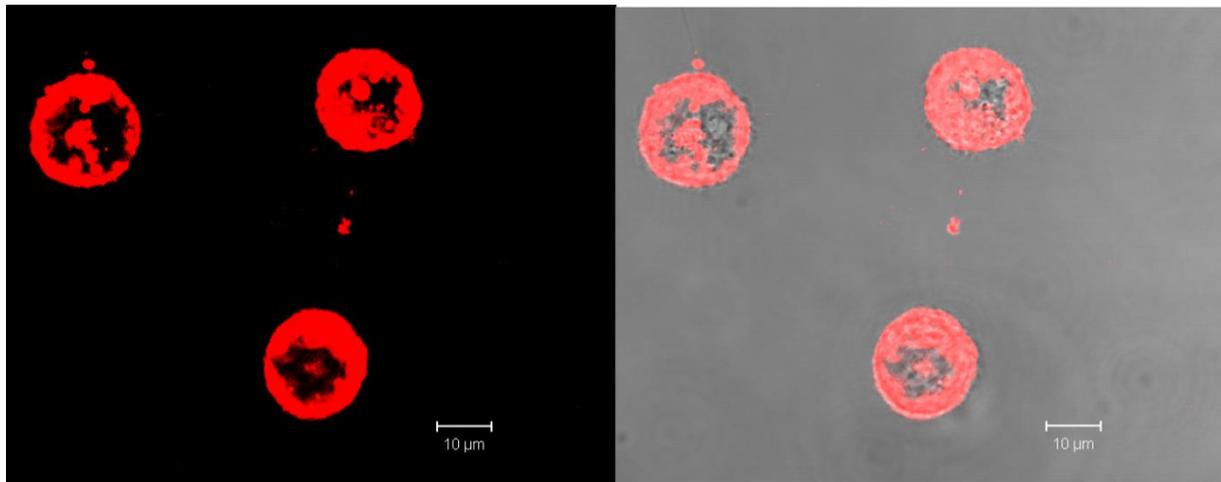


Abbildung 34: Internalisierung des $\beta 4$ Integrin-Antikörpers in PC-3-Zellen. Diese konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahme, zeigt, dass das Integrin in die Zelle internalisiert wird. Links: reiner Fluoreszenzkanal (650 nm), rechts: Überlagerung der Fluoreszenz mit dem Durchlicht.

Nach der Inkubation bei 37°C konnte nun der Antikörper nicht nur an der Zelloberfläche sondern zusätzlich auch im Zellinneren detektiert werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass eine Internalisierung des $\beta 4$ Integrin-spezifischen Antikörpers stattgefunden

Ergebnisse

hatte. Dies legte nahe, dass mit dem Antikörper auch das $\beta 4$ Integrin in die Zelle internalisiert wurde.

Somit wurde auch eine Internalisierung des Cy5-markierten Aptamers zusammen mit dem Integrin untersucht. Die Inkubation der Zellen mit dem Aptamer erfolgte nun direkt bei 37°C. Um sicherzustellen, dass das Signal auch vom internalisierten Aptamer stammt, wurde nach der Inkubation das Enzym DNase I hinzugegeben, um alle Nukleinsäuren an der Oberfläche der Zellen zu degradieren. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Aufnahmen sind in Abbildung 35 zu sehen.

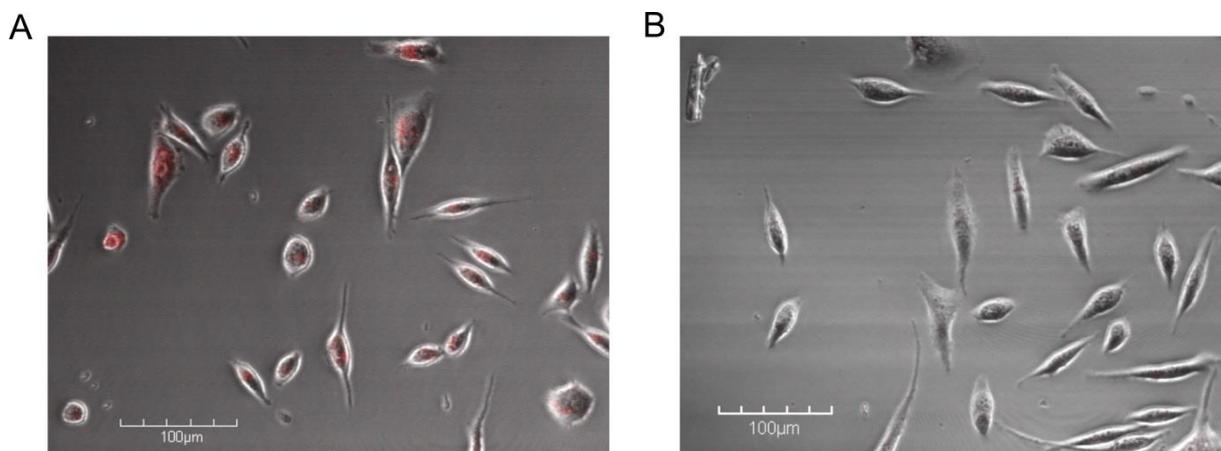


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahme der Internalisierung von IDA in PC-Zellen (A). Die Kontroll-DNA zeigt keine Bindung an die Zellen (B). Überlagerung der Fluoreszenz mit dem Durchlicht.

In Abbildung 35 A zeigen alle PC-Zellen eine rote Fluoreszenz im Zellinneren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass IDA zunächst an die Zellen gebunden und dann mit dem Integrin in die Zellen internalisiert worden ist. Im Gegensatz dazu ist bei der Kontroll-DNA keine Fluoreszenz zu detektieren (Abbildung 35 B). Dies zeigte, dass diese DNA nicht an die PC-3-Zellen gebunden hat.

Zur Analyse der Aptamer Lokalisation in der Zelle, wurden neben der Aptamerfärbung zusätzlich der Zellkern mit Hoechst 33428 (Abbildung 36) sowie die Lysosomen mit dem Farbstoff LysoTracker® Green (Abbildung 37) angefärbt.

Ergebnisse

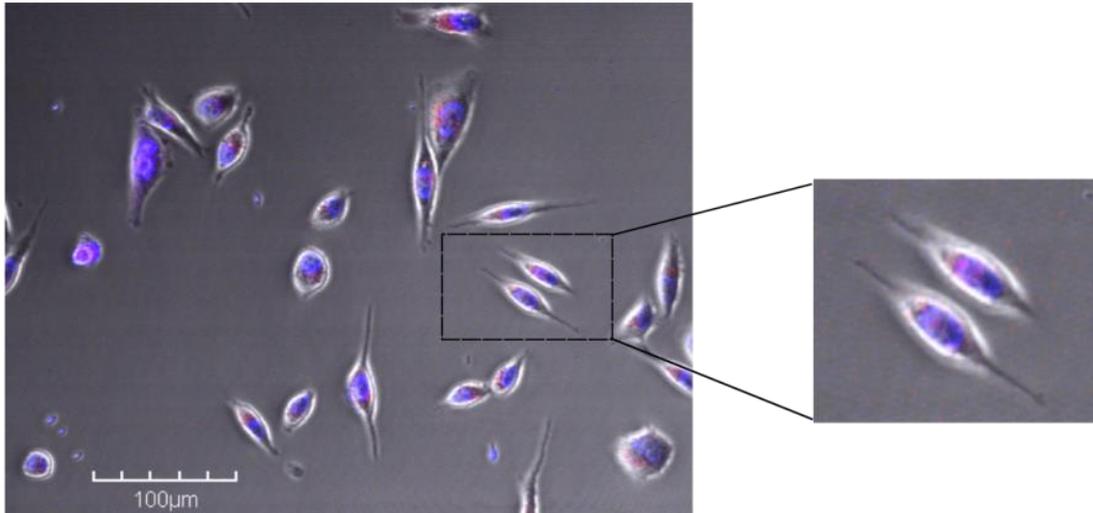


Abbildung 36: Co-Lokalisation von IDA (rot) mit Hoechst 33428 zur Färbung der DNA im Zellkern (blau). Die Signale sind teilweise überlagert.

Die Co-Färbung mit IDA und dem Hoechst-Farbstoff zeigte, dass IDA in vielen Zellen nicht vorrangig im Zellkern verteilt vorlag, sondern sich auch im Cytosol verteilte (Abbildung 36). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, ob sich IDA im Zellkern befindet oder darüber bzw. darunter.

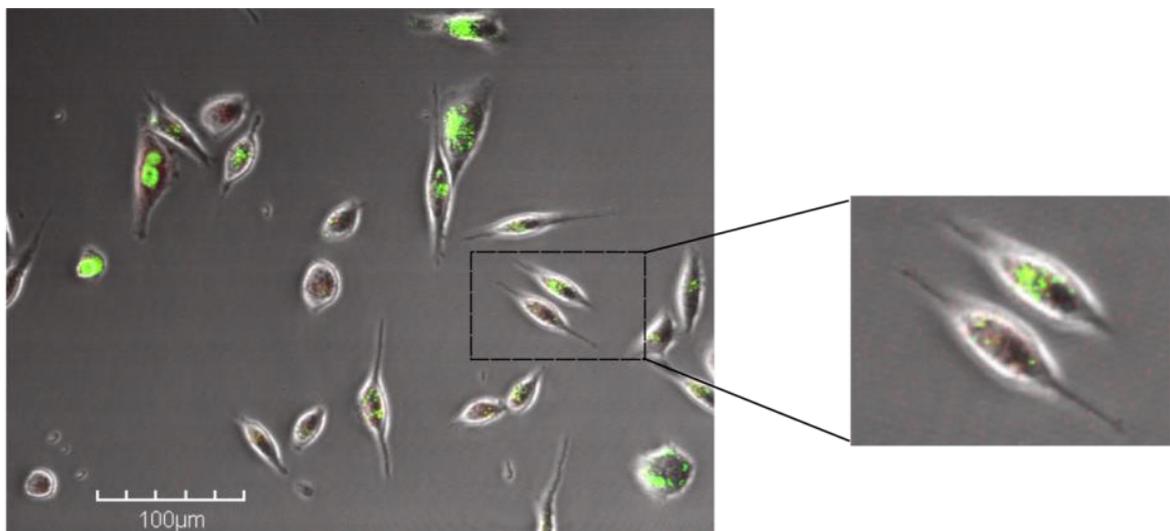


Abbildung 37: Colokalisation von IDA (rot) mit dem Lysotracker® Green zur Färbung der Lysosomen (grün). Die Signale sind teilweise überlagert.

Die Co-Färbung mit dem Lysotracker® Green ergab, eine teilweise Überlagerung mit IDA. Dies zeigt den vesikulären Transport des Aptamers. Allerdings war die durch das Cy5-vermittelte rote Fluoreszenz auch an Stellen der Zelle zu finden, die durch den Lysotracker® Green nicht gefärbt wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nur ein Teil des Aptamers in den Lysosomen abgebaut wird.

Ergebnisse

Zusätzlich zum Verbleib des Aptamers in der Zelle, sollte die Effizienz der Internalisierung von IDA ermittelt werden. Diese Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Dazu wurden die Zellen mit dem Aptamer zunächst auf Eis inkubiert. Dies sollte eine Internalisierung des Aptamers unterbinden. Nach Waschen der Zellen wurde ein Teil direkt vermessen, der andere Teil wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies sollte die Internalisierung einleiten. Nicht-internalisiertes Aptamer wurde dann mittels DNase I degradiert. Die Vermessung erfolgte anschließend. Abbildung 38 zeigt die Auftragung der Anzahl an Zellen gegen die Fluoreszenzintensität.

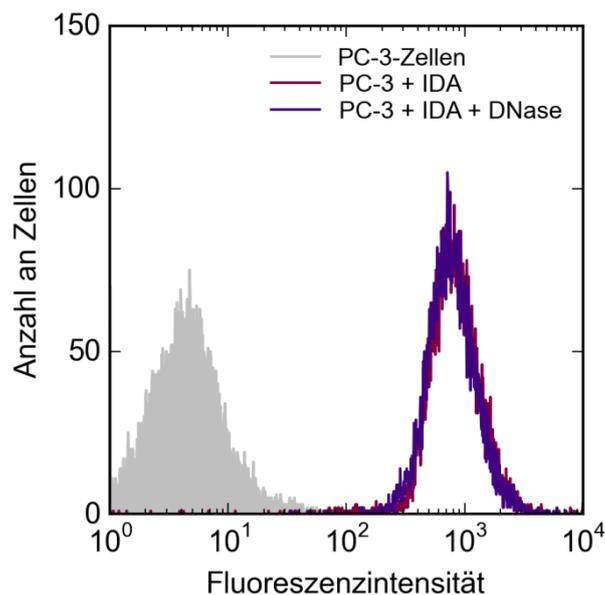


Abbildung 38: Analyse der Effizienz der Internalisierung von IDA in PC-3-Zellen. Die DNase behandelten Zellen (violett) weisen nur einen Rückgang von 2 % gegenüber den auf Eis inkubierten Zellen (rot) auf.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine Aufnahme-Effizienz von 98% nach zehnmütiger Inkubation bei 37 °C, da die Fluoreszenz-Intensität für die mit DNase I behandelten Zellen, annähernd die gleiche war, wie ohne Degradation des Aptamers.

Um herauszufinden, ob das Aptamer eine Internalisierung des $\alpha 6\beta 4$ Integrins direkt induziert, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob sich die Integrin-Menge auf der Oberfläche der PC-3-Zellen nach Inkubation mit IDA verringert. Dazu wurde das Aptamer für 5, 10 bzw. 15 min mit den PC-3-Zellen inkubiert, um eine Internalisierung des Integrins mit dem Aptamer zu gewährleisten. Anschließend wurde die Menge an Integrin mit einem $\beta 4$ Integrin-spezifischen AK durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Ergebnisse

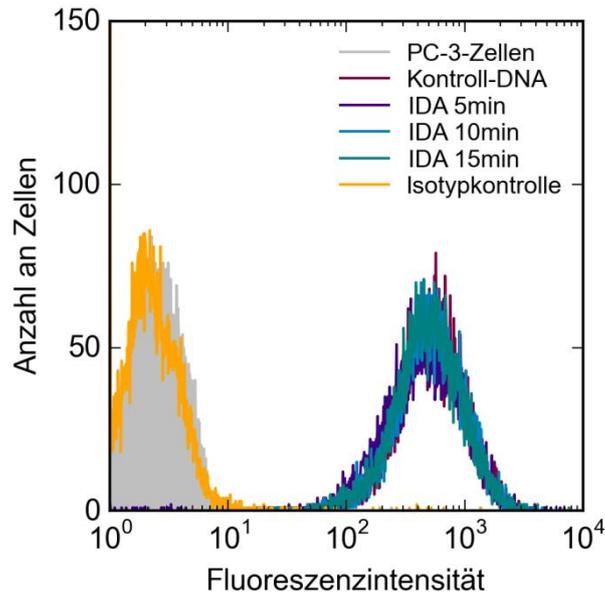


Abbildung 39: Analyse der Integrinpräsentation nach Aptamer-Inkubation. Grün: 15 min IDA + AK, blau: 10 min IDA + AK, violett: 5 min IDA + AK, rot: Kontroll-DNA + AK, orange: Isotypkontrolle

Alle mit IDA vorinkubierten Proben (blau, grün und violett) wiesen die gleiche Fluoreszenzverschiebung des $\beta 4$ Integrin-spezifischen Antikörpers auf, wie die Kontroll-DNA (rot). Deshalb konnte nicht davon ausgegangen werden, dass sich die Anzahl an $\alpha 6\beta 4$ Integrinen durch Aptamerbindung verringert. Die Isotypkontrolle zeigte keine Fluoreszenzverschiebung (orange). Dies zeigte zusätzlich, dass die Antikörper spezifisch waren.

5.5.4 Analyse der Stabilität von IDA in Medium und Blutplasma

Da die Stabilität von IDA für eine mögliche spätere Anwendung des Aptamers *in vivo* eine wichtige Rolle spielt, wurde diese über einen Zeitraum von 24h in Medium mit und ohne 10 % FKS sowie in murinem Blutplasma überprüft. Dazu wurde die radioaktivmarkierte DNA im Medium oder Plasma bei 37°C inkubiert und nach 0, 1, 5, 15 bzw. 30 min sowie 1, 2, 4, 8 und 24 h Proben entnommen. Die Analyse dieser Proben erfolgte dann mittels denaturierender PAGE. Mittels Autoradiographie konnten dann die erhaltenen Banden quantifiziert werden. Es wurde jeweils die Gesamtmenge an Radioaktivität in jeder Spur ermittelt. Dies galt dann als 100%. Daraus konnte dann der prozentuale Anteil an Vollängen-DNA berechnet werden.

Ergebnisse

Die Auftragung erfolgte mittels Python und ist in Abbildung 40 durch Auftragung des prozentualen Anteils an Volllängen-DNA gegen die Zeit gezeigt. Dies sind die Ergebnisse einer Doppelbestimmung.

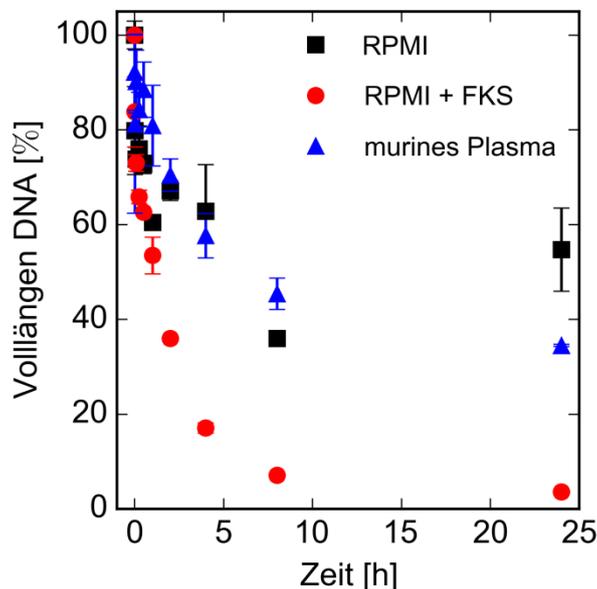


Abbildung 40: Analyse der Stabilität von IDA in Medium mit (rot) und ohne (schwarz) 10% FKS sowie in murinem Blutplasma (blau).

Für IDA konnte eine Halbwertszeit in Medium ohne Zusätze von 24 h beobachtet werden (schwarz). Bei Zugabe von 10% FKS reduzierte sich diese Zeit auf nur eine Stunde (rot). Nach weiteren vier Stunden war kaum noch intaktes IDA auf dem Gel zu detektieren. In Blutplasma dagegen konnte eine Halbwertszeit von sechs Stunden bestimmt werden (blau), während nach 24 h noch $34\% \pm 0.3$ der DNA vorhanden waren.

5.5.5 CD-Spektroskopische Analyse der Struktur von IDA

Die Analyse der Struktur des Aptamers erfolgte mittels CD-Spektroskopie. Dabei wurde die Differenz der Absorption von links oder rechts zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive, chirale Moleküle detektiert. Durch Änderung der Amplitude ließen sich so Sekundärstrukturen wie z.B. A-, B- und Z-DNA unterscheiden.^{90,91} Die Messung des Aptamers erfolgte zwischen 200-320 nm, da in dem Bereich die DNA-Basen absorbieren, unter Verwendung diverser Puffer. Dies sollte eine mögliche Ionenabhängigkeit der Struktur des Aptamers zeigen. Es wurden nur Ionen getestet, die während der SELEX in den verwendeten Puffern enthalten waren. Der Mittelwert der zehn gemessenen Spektren nach

Ergebnisse

Abzug der entsprechenden Pufferkontrollen wurde graphisch durch Auftragung der Elliptizität (mdeg) gegen die Wellenlänge (nm) dargestellt.

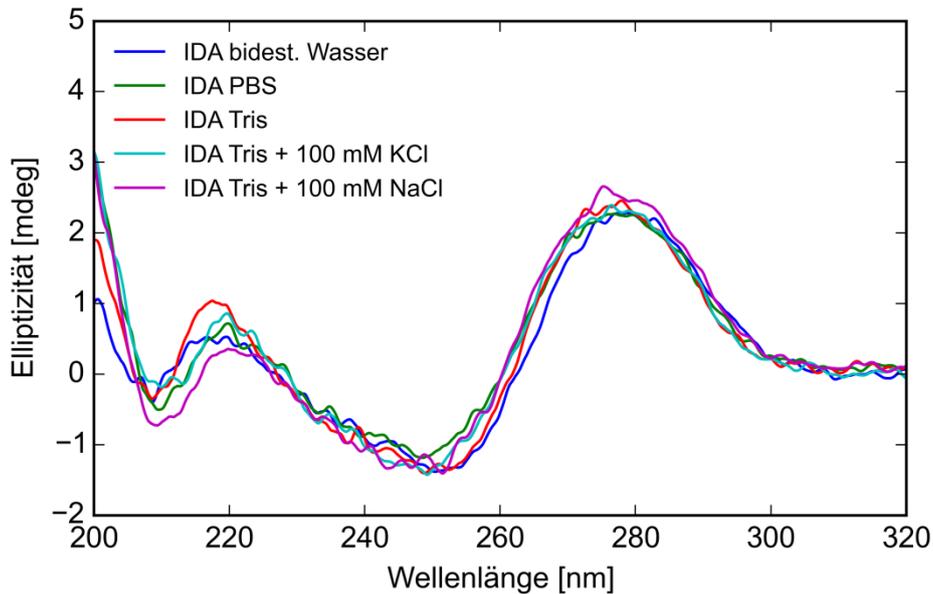


Abbildung 41: CD-spektroskopische Untersuchung von IDA in Abhängigkeit der Salzkonzentration. Die Kurven ähneln sich, sodass keine Ionenabhängigkeit festgestellt werden konnte. IDA wurden in folgenden Puffern gemessen: blau: bidest. Wasser, grün: PBS-Puffer, rot: Tris-Puffer, türkis: Tris-Puffer mit 100 mM Kaliumchlorid, violett: Tris-Puffer mit 100 mM Natriumchlorid.

Es zeigte sich keine Ionenabhängigkeit des Aptamers, da sich der Kurvenverlauf in Ab- oder Anwesenheit von Kalium oder Natriumionen bzw. auch in salzfreiem Wasser nicht veränderte. Die Messung ergab ein positives Maximum bei 219 nm, ein Minimum bei 248 nm sowie ein Maximum bei 276 nm. Dieser Graphenverlauf entsprach charakteristisch dem einer B-DNA-Stammerschleifen-Struktur.

5.5.6 Vergleich der Bindungsstellen von IDA und nc1236

Die nc1236 band zwar an PC-3-Zellen, war aber nicht in der Lage, die Integrin-Laminin-Interaktion zu blockieren. Deshalb sollte im Folgenden analysiert werden, ob sie die gleiche Bindungsstelle, wie IDA, besitzt oder an eine andere Stelle am Integrin bindet. Aus diesem Grund sollte durchflusszytometrisch analysiert werden, ob eines der beiden Cy5-markierten Aptamere durch das jeweils andere verdrängt werden kann. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

Ergebnisse

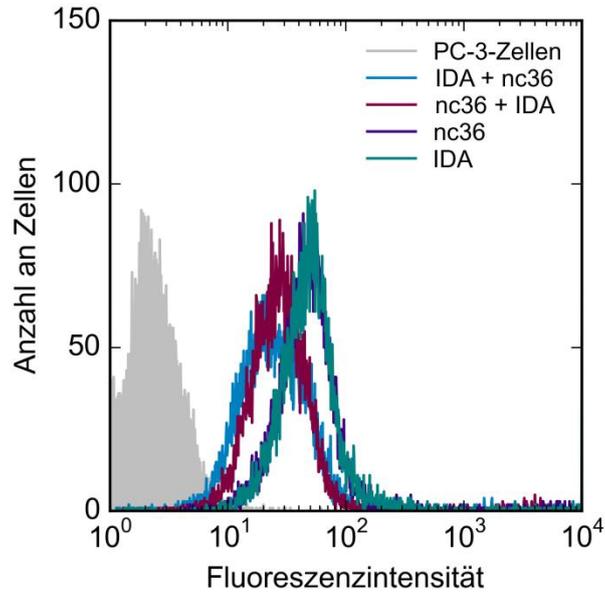


Abbildung 42: FACS-Analyse der Bindung von IDA sowie der nc1236 mit und ohne Zugabe der jeweils anderen unmarkierten Nukleinsäure im Überschuss. Die Kurvenverläufe entsprechen den unbehandelten PC-3-Zellen (grau), IDA-Cy5 (grün), IDA-Cy5 mit 5 μ M nc1236 (blau), nc1236-Cy5 (violett), nc1236-Cy5 mit 5 μ M IDA (rot).

Dabei zeigte sich, dass die beiden Aptamere nicht an die gleiche Stelle binden, da sich keine Verschiebung in der Fluoreszenz-Intensität zeigte, obwohl die jeweils andere Nukleinsäure im zehnfachen Überschuss eingesetzt wurde. Der leichte Rückgang der Bindung (blau und rot) gegenüber den einzelnen Aptameren (grün und violett; von grün überlagert) ist vermutlich auf eine zu hohe Konzentration an Nukleinsäuren zurückzuführen, die z.B. Aggregate bilden können und somit weniger bindungsfähige Spezies vorliegen.

Aufgrund der unterschiedlichen Binderegionen der beiden Aptamere stellte sich die Frage, ob die nc1236 ebenfalls die α 6-Untereinheit, oder stattdessen die β 4-Untereinheit des Integrins, bindet. Der Nachweis der Bindungsspezifität erfolgte erneut mittels EMSA.

Ergebnisse

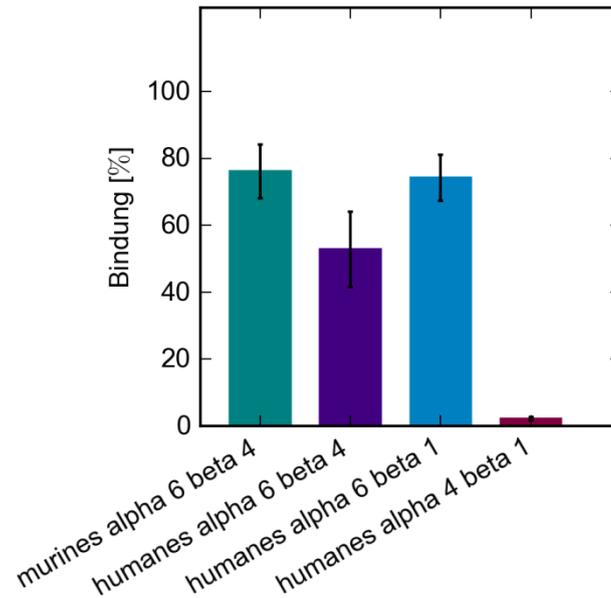


Abbildung 43: Analyse der Spezifität der Bindung von nc1236. Es konnte eine Bindung sowohl an das humane (violett) als auch an das murine $\alpha 6\beta 4$ Integrin (grün) gezeigt werden. Im Gegensatz zum humanen $\alpha 4\beta 1$ (rot) ist allerdings auch eine Bindung ans $\alpha 6\beta 1$ Integrin (blau) zu beobachten. Dies zeigt eine Spezifität zur $\alpha 6$ Integrin-Untereinheit.

Die nc1236 band sowohl an das humane $\alpha 6\beta 4$ Integrin ($53\% \pm 11$) als auch an das $\alpha 6\beta 1$ -Integrin ($74\% \pm 7$), jedoch nicht an das $\alpha 4\beta 1$ Integrin ($2\% \pm 1$). Dabei war die prozentuale Bindung jedoch bei beiden $\alpha 6$ Integrinen etwas geringer als bei IDA. Dennoch zeigte die nc1236 dieselbe Spezifität für die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit. Neben den humanen $\alpha 6$ Integrinen band die nc1236 ebenfalls an das murine $\alpha 6\beta 4$ Integrin ($76\% \pm 8$).

5.6 Verkürzung von IDA anhand von Sekundärstrukturanalysen

Die Verkürzung des Aptamers erfolgte auf Basis von Sekundärstrukturanalysen durch den *RNA structure webserver*.⁹² Die Wahrscheinlichkeit, ob ein Nukleotid so vorliegt wie durch die Sekundärstrukturvorhersage vorgeschlagen, wird durch die Farbcodierung angegeben. Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse der Analyse von IDA sowie die daraus resultierenden Verkürzungen IDA-A und IDA-B.

Ergebnisse

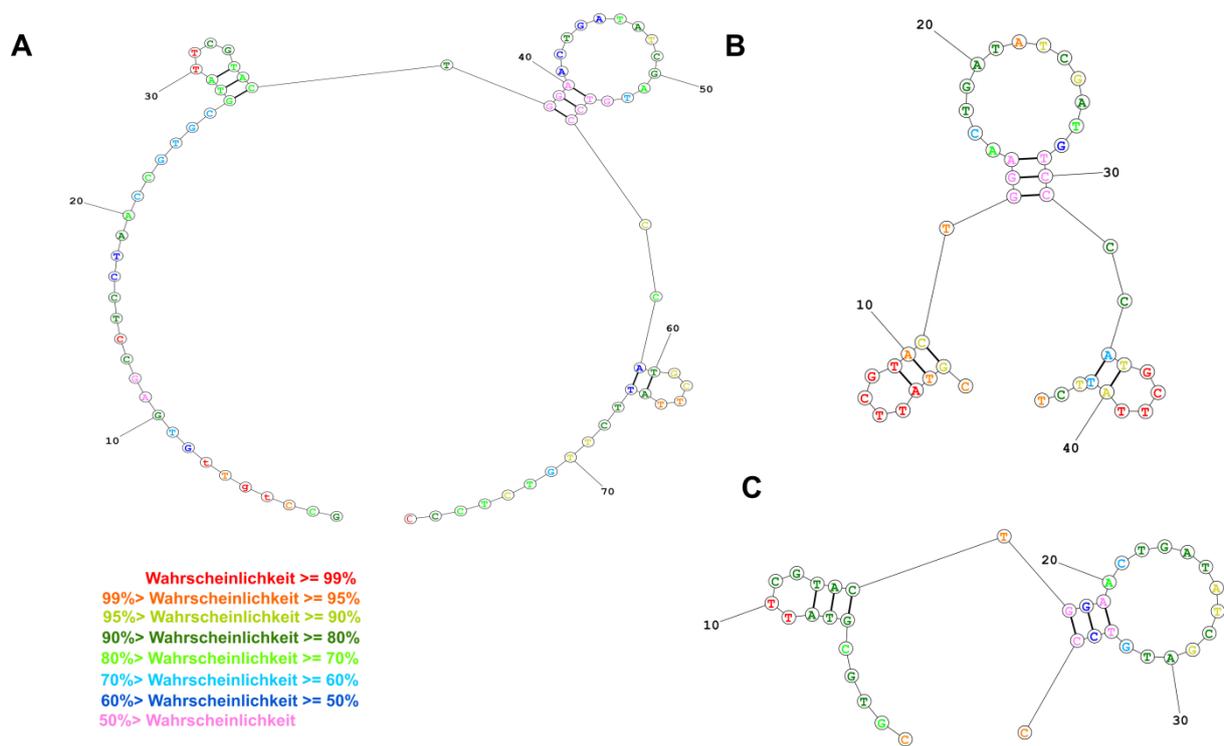


Abbildung 44: Sekundärstrukturvorhersage durch den *RNA structure webserver*. Die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung zeigt sich durch die Farbcodierung. A) IDA besitzt drei potentielle Stammschleifen. Diese Schleifen sind trotz Verkürzung auch in IDA-A (B) sowie in IDA-B (C) vorhanden.

Die Strukturanalyse zeigte für IDA zwei Stammschleifen im vormals randomisierten Teil der Nukleinsäure. Dabei zeigte der erste Loop eine 70-80%ige Wahrscheinlichkeit, dass diese Basen wirklich gepaart vorliegen. Die zweite und größere Stammschleife zeigte dagegen lediglich eine Wahrscheinlichkeit von unter 50%. Eine dritte Schleife enthielt noch einen Teil des reversen Primers. Dies ist mit 80-90 bzw. 50-60% wieder wahrscheinlicher. Im Bereich des Vorwärtsprimers zeigte sich keine Basenpaarung. Davon ausgehend wurden zwei Verkürzungen vorgenommen. Zum einen wurden für IDA-B alle Stammschleifen mit einbezogen, zum anderen wurden für IDA-A die Primerregionen komplett entfernt. Dabei konnten bei beiden Verkürzungen die angezeigten Strukturelemente erhalten werden. In den beiden kleineren Schleifen konnte dabei die Wahrscheinlichkeit einer Ausbildung sogar erhöht werden. Es folgte nun im Anschluss die Untersuchung der Bindungseigenschaften.

5.6.1 Bindungs- und Inhibitionsanalysen von IDA-A und IDA-B

Nach der erfolgten Verkürzung sollten die DNAs IDA-A sowie IDA-B auf ihre Bindung an PC-3-Zellen sowie auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Laminin-Integrin-Interaktion untersucht werden. Dazu erfolgte zunächst der Bindungstest mit Cy5-modifizierten IDA-A und IDA-B durchflusszytometrisch (siehe Abbildung 45).

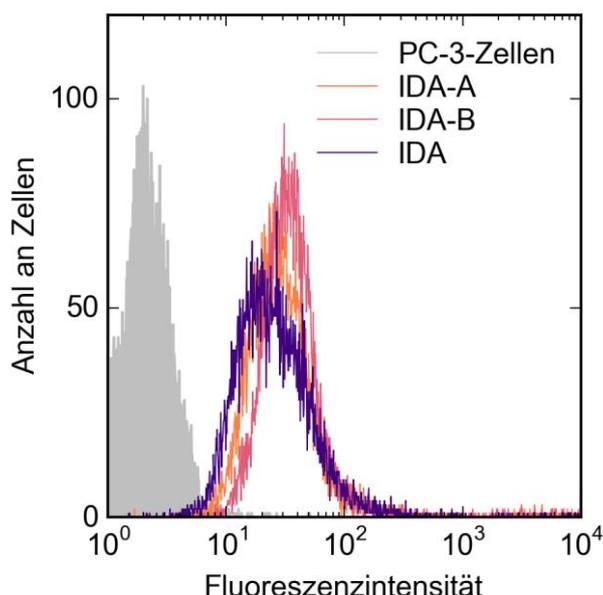


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der verkürzten DNAs IDA-A und IDA-B. Die Kurven entsprechen den unbehandelte Zellen (grau), IDA (violett), IDA-A (orange) sowie IDA-B (pink). Beide Verkürzungen binden an die Zellen.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten sowohl IDA-A (orange) als auch IDA-B (pink) eine Fluoreszenzverschiebung ähnlich dem langen Aptamer IDA (violett). Insgesamt band IDA-B am besten an die Zellen, gefolgt von IDA-A und dann IDA.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die Verkürzungen in der Lage waren, die Bindung der PC-3-Zellen ans Laminin-332 zu inhibieren. Der Versuch bestand ebenfalls aus der Inkubation von PC-3-Zellen, die mit den IDA-Varianten behandelt worden waren, in einer Laminin-332-beschichteten Mikrotiterplatte. Nach dem Waschen dieser Platte erfolgte die Detektion bindender Zellen mittels des CellTiter-Glo[®] Assays. Abbildung 46 zeigt die Auftragung der prozentualen Bindung der einzelnen Nukleinsäuren.

Ergebnisse

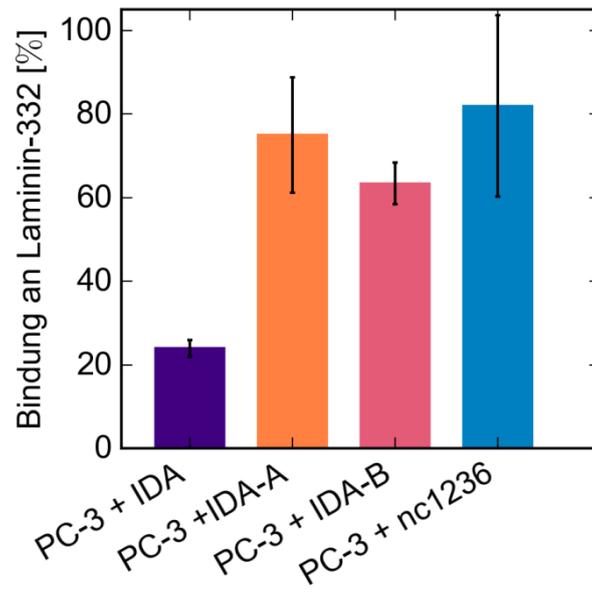


Abbildung 46: Analyse der Inhibition der Integrin-Laminin Interaktion durch IDA und dessen verkürzte Varianten. Während das lange Aptamer eine Reduktion der Bindung der PC-3 Zellen zeigte (violett), zeigten die kurzen Varianten (orange und pink) eine ähnlich Adhäsion der Zellen wie die nicht-inhibierende Nukleinsäure nc1236 (blau). Somit waren IDA-A und IDA-B nicht mehr in der Lage die Interaktion zu inhibieren.

In Anwesenheit des langen Aptamers (violett) banden nur 24 ± 2 % der PC-3-Zellen an die Laminin-332-Matrix. Im Gegensatz dazu banden trotz Inkubation mit IDA-A (orange) und IDA-B noch 75 ± 14 % sowie 63 ± 5 % der Zellen. Diese Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die der nicht-inhibierenden Kontrolle nc1236 mit 81 ± 22 %. Somit konnte nur das lange Aptamer die Bindung der PC-3-Zellen ans Laminin-332 inhibieren.

5.6.2 Strukturelle Untersuchung der verkürzten Varianten von IDA

Die Analyse der Struktur, erfolgte die Untersuchung der Struktur von IDA-B mittels CD-Spektroskopie. Die Messung erfolgte analog zu 5.5.5.

Ergebnisse

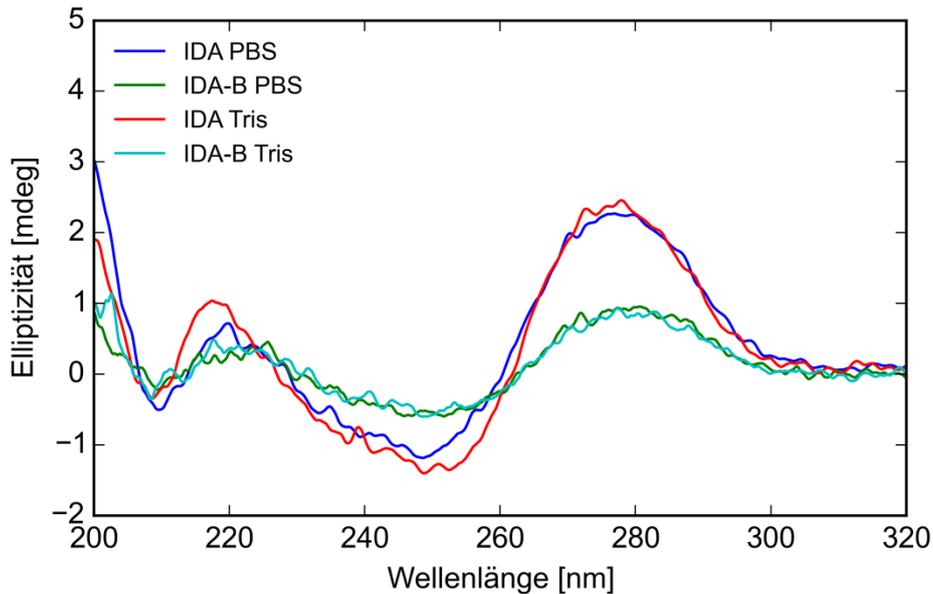


Abbildung 47: CD-spektroskopische Untersuchung von IDA und dessen verkürzte Variante IDA-B in PBS sowie Tris-Puffer. Es zeigte sich eine Verringerung der Amplitude bei den Verkürzungen, aber keine Änderung des Kurvenverlaufs. Somit blieb die Stammschleifenstruktur erhalten.

Abbildung 47 zeigt keine Veränderung des Kurvenverlaufs der Verkürzung im Gegensatz zum langen Aptamer. Somit konnte keine Änderung der Struktur gezeigt werden. Allerdings ist war verringerte Amplitude zu beobachten.

5.7 Postselektive Modifikation von IDA

5.7.1 Thio-Modifikation

Zur Erhöhung der Stabilität des Aptamers erfolgte die Modifikation der Nukleinsäure unter Verwendung von 2'-Deoxyadenosin-5'-O-(1-thiotriphosphat). Dieses ATP-Derivat kann mittels konventioneller PCR eingebaut werden. Die anschließende Bindungsanalyse Thio-modifizierter Nukleinsäuren an PC-3-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch (Abbildung 48).

Ergebnisse

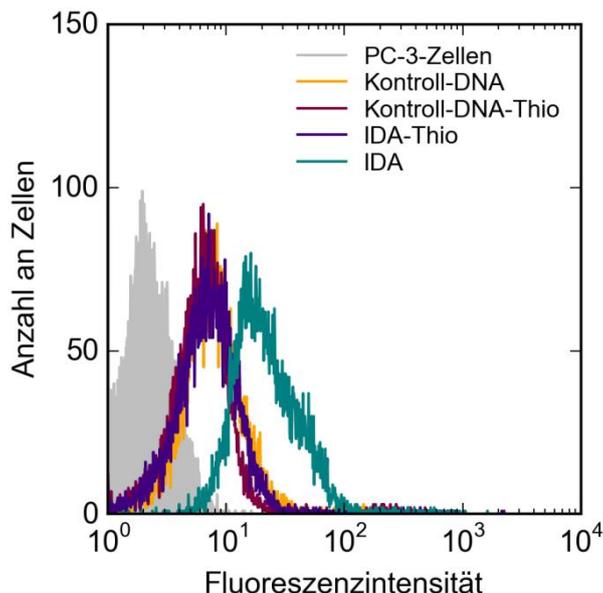


Abbildung 48: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des Thio-modifizierten Aptamers. Grau: unbehandelte PC-3-Zellen, violett: IDA Thio-modifiziert, grün: IDA unmodifiziert, rot: Kontroll-DNA unmodifiziert, orange: Kontroll-DNA Thio-modifiziert.

Das unmodifizierte Aptamer IDA (grün) zeigte, wie erwartet, eine höhere Fluoreszenzverschiebung als die unmodifizierte Kontroll-DNA (orange). Im Gegensatz dazu zeigte die Thio-modifizierte Variante von IDA (violett) eine Verschiebung in der gleichen Größenordnung wie, sowohl die unmodifizierte, als auch die Thio-modifizierte Kontroll-DNA. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass das Thio-modifizierte IDA nicht mehr an die PC-3-Zellen binden konnte.

5.7.2 PEGylieren von IDA

Da für eine Anwendung *in vivo* die Ausscheidung des Aptamers mittels renaler Filtration ein kritischer Punkt sein kann, wurde das Aptamer postselektiv mit Polyethylglykol um 1214 g/mol vergrößert. Dies erfolgte mittels EDC/NHS-Kopplung unter Verwendung eines Methyl-PEG₂₄-NHS Esters sowie der jeweiligen aminomodifizierten Nukleinsäure. Nach der Reaktion wurde der Erfolg der PEGylierung mittels 10 % denaturierender PAGE überprüft (Abbildung 49).

Ergebnisse

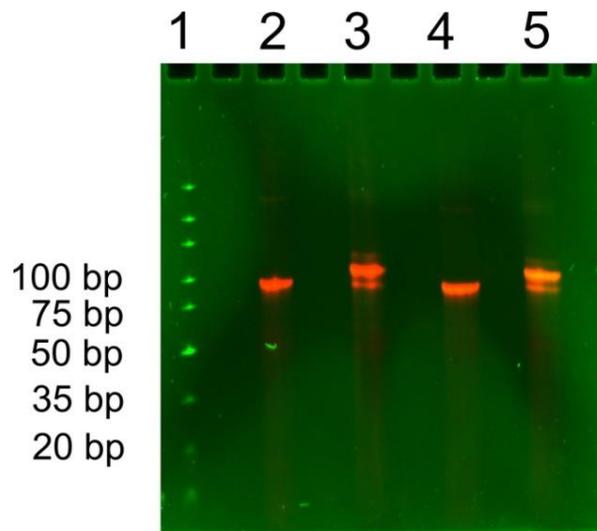


Abbildung 49: Analyse der Kopplungseffizienz von IDA und der Kontroll-DNA mit Polyethylenglykol. Die Banden entsprechen: Ultra Low Range DNA Ladder (1), IDA unmodifiziert (2), IDA-PEGyliert (3), Kontroll-DNA unmodifiziert (4), Kontroll-DNA PEGyliert (5).

Beide PEGylierten Nukleinsäuren wiesen die erwartete Vergrößerung von 1214 g/mol (~1.2 kDa) auf. Allerdings konnte für beide Reaktionsansätze auch noch die Eduktbande bei 80 bp detektiert werden. Die berechnete Kopplungseffizienz betrug für IDA 61% und für die Kontroll-DNA 63%. Anschließend erfolgte die Analyse der Bindung an PC-3-Zellen durchflusszytometrisch.

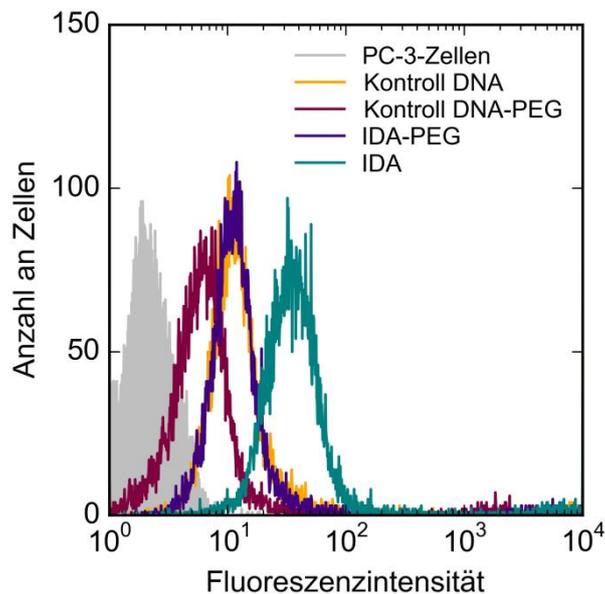


Abbildung 50: Analyse der Bindung des PEGylierten Aptamers. Grau: unbehandelte Zellen, Grün: IDA unmodifiziert, violett: IDA PEGyliert, dunkelorange: Kontroll-DNA unmodifiziert, rot: Kontroll-DNA PEGyliert. Beide PEGylierten Nukleinsäuren binden weniger an die PC-3-Zellen als die unmodifizierten Varianten.

Die Bindung des PEGylierten (blau) gegenüber dem unmodifizierten Aptamer (grün) sank um 43%, die Fluoreszenzintensität war entsprechend zu geringeren Werten verschoben. Die Bindung der PEGylierten Kontroll-DNA war sogar um 66% geringer als für die unmodifizierte Kontroll-DNA. Dies zeigte, dass die PEGylierten Nukleinsäuren in geringerem Maße unspezifisch an die Zellen binden. Trotzdem konnte das Aptamer auch mit einer 3'-PEG-Modifikation noch binden.

5.8 Aptamer-vermitteltes Einschleusen von miRNA

Da nachgewiesen werden konnte, dass das Aptamer IDA von PC-3-Zellen internalisiert wird, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob ein Einschleusen von miRNA in die Zellen mittels des Aptamers möglich ist. Als „*proof of principle*“ wurde die miRNA 29A ausgesucht, die eine verminderte Expression des $\beta 4$ Integrins bewirken sollte.⁹³ Abbildung 51 zeigt die Sekundärstrukturvorhersage der herzustellenden prä-miRNA.

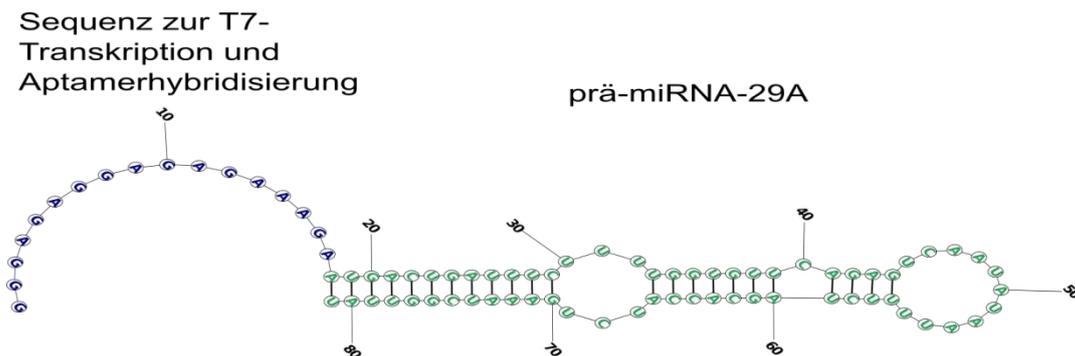


Abbildung 51: Strukturanalyse der prä-miRNA-29A verlängert um eine Sequenz benötigt für die T7-Transkription sowie für eine spätere Verknüpfung mit dem Aptamer. Die Struktur wurde mittels *RNA Structure Webserver* erstellt.

Um die miRNA zu transkribieren und im späteren Verlauf mit dem Aptamer zu hybridisieren, wurde am 5' Ende der RNA eine zusätzliche Sequenz eingebaut. Diese liegt ungepaart vor und stört die Faltung der miRNA nicht.

Zur Herstellung dieser RNA wurde das entsprechende reverse ssDNA-Template käuflich erworben und mit einem entsprechenden Primer hybridisiert. Nach erfolgreicher Strangauffüllung erfolgte die T7-Transkription mit dem erhaltenen dsDNA-Template unter Verwendung 2'-F-modifizierter Nukleotide. Dies sollte für eine höhere Stabilität der RNA sorgen. Die hergestellte prä-miRNA wurde dann mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Der Rückgang des $\alpha 6\beta 4$ Integrins auf der Zelloberfläche der transfizierten PC-3-Zellen wurde

Ergebnisse

nach 24 h durchflusszytometrisch unter Verwendung eines $\beta 4$ Integrin-spezifischen AKs analysiert.

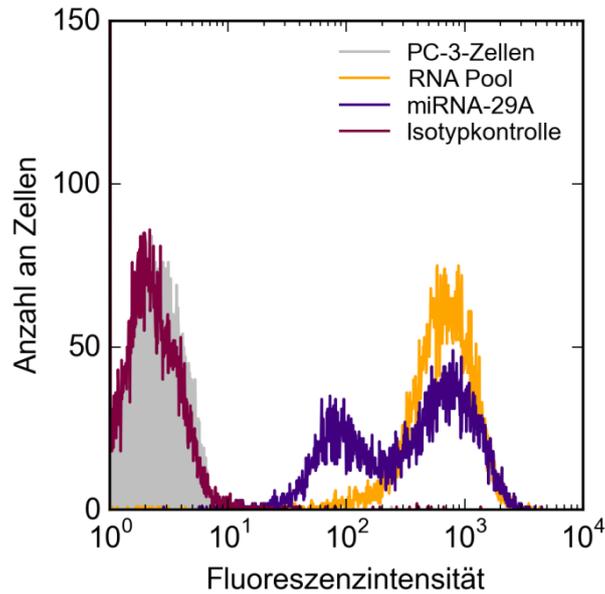


Abbildung 52: Analyse der Transfektion von PC-3-Zellen mit der miRNA-29A. Grau: unbehandelte Zellen, violett: $\beta 4$ Integrin-AK + mikroRNA-29A, orange: $\beta 4$ Integrin-AK + RNA-Pool, rot: Isotypkontrolle.

Es zeigte sich, dass ein Teil der PC-3-Zellen weniger Integrin auf der Zelloberfläche präsentierte (violett), da sich zwei Maxima in der Fluoreszenzintensität ausgebildet hatten. Es wurden also zwei Populationen gebildet. Der transfizierte RNA-Pool zeigte diesen Rückgang in der Fluoreszenzintensität nicht (gelb). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die mikroRNA in den Zellen zumindest teilweise aktiv war.

In einem nächsten Schritt müsste das Aptamer an die Leadersequenz hybridisiert werden. Eine Aptamer-vermittelte Aufnahme hätte dann ebenfalls, ähnlich wie bei der Transfektion mit Lipofectamin zu einem Rückgang der Integrinexpression führen sollen.

6. Diskussion

Das Laminin-bindende $\alpha 6\beta 4$ Integrin wird in einer Vielzahl von Epithel-, Schwann- und Endothelzellen aber auch von diversen Krebszellen produziert.¹⁶ Dabei erfolgt in gesunden Zellen durch die Laminin-Integrin-Interaktion die Ausbildung stabiler, adhäsiver Strukturen, genannt Hemidesmosomen, während bei Tumorzellen die Hemidesmosomen aufgelöst werden und eine intrazelluläre Relokalisation des Integrins an die Aktinfilamente erfolgt.⁵ Daraufhin entstehen bewegliche Strukturen wie Filopodia und Lamellen.²⁴ Es werden zudem Signalkaskaden aktiviert, die das Tumorwachstum, die Invasion und die Metastasierung von Krebszellen weiter fördern.²⁵⁻²⁷ Da eine gesteigerte $\alpha 6\beta 4$ Integrin-Expression mit einer schlechteren Prognose von Tumorpatienten korreliert, wäre die gezielte Inhibition der Laminin-Integrin-Interaktion außerhalb der Hemidesmosomen von besonderem therapeutischem Interesse.

Zurzeit befindet sich jedoch kein $\alpha 6\beta 4$ Integrin-Inhibitor in der Anwendung oder in klinischen Studien. Allerdings wurden bereits zwei Antikörper beschrieben, die in der Lage sind, die Integrin-Laminin-Interaktion zu inhibieren.^{94,95} Allerdings können Antikörper eine hohe Immunogenität aufweisen bzw. aufgrund ihrer Größe schlecht in Tumore eindringen.

Eine weitere Molekülklasse, die ähnlich wie Antikörper Zielmoleküle spezifisch und strukturabhängig erkennen kann, sind Aptamere. Seit ihrer ersten Beschreibung 1990 wurden über 900 verschiedene Aptamere selektiert, von denen sich bereits zehn in klinischen Studien finden. Im Gegensatz zu Antikörpern lassen sie sich durch chemische Synthese im großen Maßstab ohne Charge-zu-Charge-Variation herstellen. Weitere Vorteile gegenüber proteinbasierten Liganden sind die geringen Herstellungskosten und die hohe thermische Stabilität. Aufgrund ihrer kleineren Größe besitzen sie eine höhere Bioverfügbarkeit und können leichter in Tumore eindringen.⁴³ Somit war das Ziel dieser Arbeit die Selektion von Aptameren zur Inhibition der $\alpha 6\beta 4$ Integrin-Laminin-332-Interaktion.

Insgesamt sind DNA- und RNA-Aptamere funktionell sehr ähnlich. Dabei sind DNA-Aptamere aufgrund ihrer Deoxyribose weniger reaktiv. Sie besitzen eine kleinere Furche und sind schlechter für Enzyme zugänglich.⁹⁶ Deshalb besitzen sie gegenüber RNA-Aptameren eine höhere chemische Stabilität. RNA dagegen kann diversere Tertiärstrukturen ausbilden, was zu einer höheren Affinität führen kann. Jedoch sind DNA-Aptamere mittels Festphasensynthese viel leichter im großen Maßstab herzustellen sowie zu modifizieren. Da die Selektion mittels Zell-SELEX erfolgen sollte, wurde die Entscheidung zugunsten von

DNA-Aptameren getroffen. Diese lassen sich leicht Fluoreszenz markieren bzw. Fluoreszenzmarkiert käuflich erwerben, sodass eine Analyse der Bindung durchflusszytometrisch vereinfacht wird. Zudem lassen sich RNA-Aptamere bisher nur bis zu einer Länge von 60 nt käuflich erwerben, sodass eine Verkürzung der ursprünglich selektierten Aptamere unumgänglich wäre. Da eine Verkürzung aber nicht immer ohne Affinitätsverlust möglich ist, wurde die Selektion von Aptameren zur $\alpha\beta4$ Integrin-Inhibition mit einer DNA-Bibliothek begonnen.⁹⁶

6.1 Selektion von Aptameren mit Affinität für das $\alpha\beta4$ Integrin

Die Selektion von Aptameren erfolgte zunächst mit $\alpha\beta4$ Integrin-präsentierenden PC-3-Zellen. Diese Zellen entstammen der Knochenmetastasierung eines Grad IV Prostata Adenocarcinoms und zeigen ein stark aggressives Verhalten.⁹⁷ Da sie eine hohe Expressionsrate des $\alpha\beta4$ Integrin aufweisen, eigneten sie sich sehr gut für eine Zell-SELEX Integrin-spezifischer Aptamere. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass das Zielprotein in seiner natürlichen Konformation vorkommt und Aptamere selektiert werden können, die auch im zellulären Kontext spezifisch binden. Normalerweise wird dabei diese Methode genutzt, um verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden, sodass ein genaues Zielmolekül nicht bekannt sein muss.

Im Falle der hier vorgestellten Arbeit sollten jedoch Aptamere selektiert werden, die spezifisch an die $\beta4$ Integrin-Untereinheit binden, da diese Untereinheit für die Laminin-Bindung und damit ein hohes Metastasierungspotential essentiell ist. Deshalb wurden in einer Prä-SELEX zunächst PC-3- $\beta4$ -Integrin-*Knockdown*-Zellen verwendet, um Nukleinsäuren auszusortieren, die an andere Zelloberflächenproteine binden.

Einen ähnlichen Ansatz zur Target-spezifischen Zell-SELEX benutzen auch schon Meyer *et al.* 2013.⁵⁸ Dabei setzten sie allerdings Zellen in der SELEX ein, die das Zielmolekül überpräsentierten und nutzten die Ursprungszellen ohne Zielmolekül in der Prä-SELEX.⁵⁸ Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass die Zellen eine sehr hohe Anzahl an Zielmolekülen präsentieren, sich aber nur in diesem Punkt von ihren Ursprungszellen unterscheiden sollten.

Im Gegensatz zur Variante von Meyer führte die Zell-SELEX unter Verwendung von *Knockdown*-Zellen, wie hier in dieser Arbeit verwendet, nicht zu der benötigten Spezifität. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das $\alpha\beta4$ Integrin nicht im Überschuss auf der

Diskussion

Oberfläche der PC-3-Zellen präsentiert worden ist, sondern nur in seinem regulären Expressionslevel vorlag und es somit zu viele andere Zelloberflächenproteine gab, an die die Nukleinsäuren leichter und affiner binden konnten.

Dies zeigt unter anderem auch der steile Anstieg an benötigten PCR-Zyklen in Runde sechs, als statt der Zell-SELEX eine konventionelle SELEX unter Verwendung des rekombinanten Proteins durchgeführt wurde. Wahrscheinlich besaß die Bibliothek aus Runde fünf eine nur geringe Anzahl an Integrin-bindenden Nukleinsäuren. Eine konventionelle SELEX mit dem gereinigten, rekombinanten Protein bietet den Vorteil, dass sich Aptamere sehr spezifisch für das gewünschte Zielmolekül selektieren lassen. Zusätzlich lässt sich diese Form der SELEX sehr schnell und vergleichsweise einfach durchführen. Das Integrin wurde dafür auf die magnetischen Partikel mittels EDC/NHS-Kopplung immobilisiert. Diese erfolgt über freie Aminogruppen des Proteins z.B. durch Lysine. Diese Kopplungsmethode besitzt gegenüber der früher angewendeten Kopplung über Streptavidin-Biotin den Vorteil, dass keine weiteren Proteine während der SELEX zugegen sind.⁹⁸ Diese führen in der Regel zur Anreicherung nicht Zielmolekül-spezifischer Nukleinsäuren, welches durch eine ganze Reihe an „versehentlich“ selektierten Streptavidin-Aptameren belegt wird.⁹⁹

Mittels EDC/NHS-Kopplung lässt sich allerdings kein Einfluss auf die Orientierung des Proteins auf den Partikeloberfläche nehmen. Eine Möglichkeit der gerichteten Immobilisierung wäre die Verwendung von *Tags*, eigentlich genutzt zur Reinigung der rekombinanten Proteine. Dabei besitzt das rekombinante $\alpha 6\beta 4$ Integrin einen Hexa-His-Tag (sechs Histidine), mit dem die Immobilisierung an Kobalt- oder Nickel-beschichtete magnetische Partikel möglich wäre. Allerdings zeigten Studien bereits im Vorfeld, dass sich während der Waschschrte häufig das Protein wieder von den Partikeln löste. Da bei der EDC/NHS-Kopplung eine kovalente, feste Bindung entsteht, konnte der Proteinverlust durch diese Methode ausgeschlossen werden.

Für die Partikel-basierte SELEX wurde das humane, rekombinante $\alpha 6$ (X1) $\beta 4$ Integrin verwendet. Während die $\beta 4$ -Untereinheit extrazellulär nur eine Isoform besitzt, können durch alternatives Spleißen drei $\alpha 6$ -Isoformen entstehen. Dabei ist die X1-Isoform diejenige die auf Zellen ubiquitär vorkommt.

Während der sieben folgenden Runden erfolgte die Erhöhung der Waschschrte jeweils um zwei, was zu einer Erhöhung der SELEX-Stringenz führen sollte. Zusätzlich wurde in Runde zehn die Anzahl an Integrinen auf der Oberfläche der magnetischen Partikel halbiert. Dies

Diskussion

sollte ebenso zu einer Anreicherung hochaffiner Spezies führen. Zur Anreicherung inhibierender Spezies wurde ab Runde elf außerdem Laminin-332 hinzugegeben. Da sich ab Runde neun die Anzahl an PCR-Zyklen verringert hatte, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Anreicherung bindender Nukleinsäuren stattgefunden hatte.

Nach fünf Selektionsrunden mit PC-3-Zellen und sieben mit rekombinantem Integrin wurde die SELEX beendet. Die Bibliotheken der Runde null, sechs, zehn und zwölf wurden über den Vorwärtsprimer fluoreszenzmarkiert und mittels Durchflusszytometrie sowohl auf die Bindung an PC-3 als auch an die PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen überprüft. Die Beobachtung, dass die PCR zur Fluoreszenzmarkierung für die Bibliotheken der Runde 10 und 12 geringere Ausbeuten aufwies als die nicht selektierte Ausgangsbibliothek, könnte auf einen erhöhten Anteil von Sekundärstrukturen der enthaltenen Nukleinsäuremoleküle hindeuten. Auch das Erscheinen von Primer-Dimeren in der PCR der letzten SELEX-Runde weist darauf hin.

Die Bindungsanalysen zeigten dann einen Anstieg bindender Nukleinsäuren in den Bibliotheken höherer Selektionsrunden, sodass von einer erfolgreichen Anreicherung ausgegangen werden konnte. Allerdings band die Bibliothek aus Runde 12 auch an die PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen, sodass von einem Verlust an β 4 Integrin-spezifischen Nukleinsäuren ausgegangen werden musste.

Deshalb erfolgte sowohl die Klonierung der Bibliothek aus Runde 12 als auch die aus Runde 10, da bei dieser die Bindung an die PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*-Zellen wesentlich geringer ausfällt. Zur Klonierung wurden das Plasmid pUC-19 sowie die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoR1 und HindIII ausgewählt. Problematisch dabei könnte sein, dass die Schnittstellen der Nukleasen auch im randomisierten Bereich der jeweiligen Spezies vorkommen könnten. Alternativ hätte deshalb auch eine TA-Klonierung erfolgen können, allerdings war die Ausbeute positiver Klone in vorherigen Experimenten sehr gering, sodass in diesem Fall darauf verzichtet wurde. Die verwendete Methode führte erfolgreich zur Sequenzierung und Identifikation von 20 Sequenzen, diese wiesen allerdings keine Sequenzhomologien oder konservierten Motive auf. Dies deutet auf eine immer noch recht hohe Diversität der Runden 10 und 12 hin. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die 20 sequenzierten Nukleinsäuren eine repräsentative Stichprobe der Nukleinsäurebibliothek darstellten und sich eine solche nur begrenzt über die Sequenzierung einzelner Nukleinsäuren verwirklichen lassen würde, wäre das *Next Generation Sequencing* (NGS) für die Auswertung der SELEX vorteilhaft gewesen. Diese Technik ermöglicht die

Sequenzierung selbst hochdiverser Nukleinsäurebibliotheken mit nahezu 100%iger Abdeckung, während beim Klonieren häufig nur stark angereicherte Sequenzspezies identifiziert werden können. Zusätzlich wird durch NGS eine Selektion für bestimmte Epitope des Zielmoleküls möglich. So selektierten Blind *et al.* ein Aptamer für ein bestimmtes gp120-Epitop, in dem sie ab Runde sieben neben der SELEX mit dem Wildtyp auch eine SELEX mit einer Mutante durchführten.¹⁰⁰ Ein anschließender Vergleich angereicherter Sequenzen in beiden SELEX-Varianten führte dann zur Identifikation von Sequenzen, die an ein bestimmtes Epitop binden.¹⁰⁰ Abbildung 53 zeigt die Strategie dieser SELEX sowie deren Verlauf.

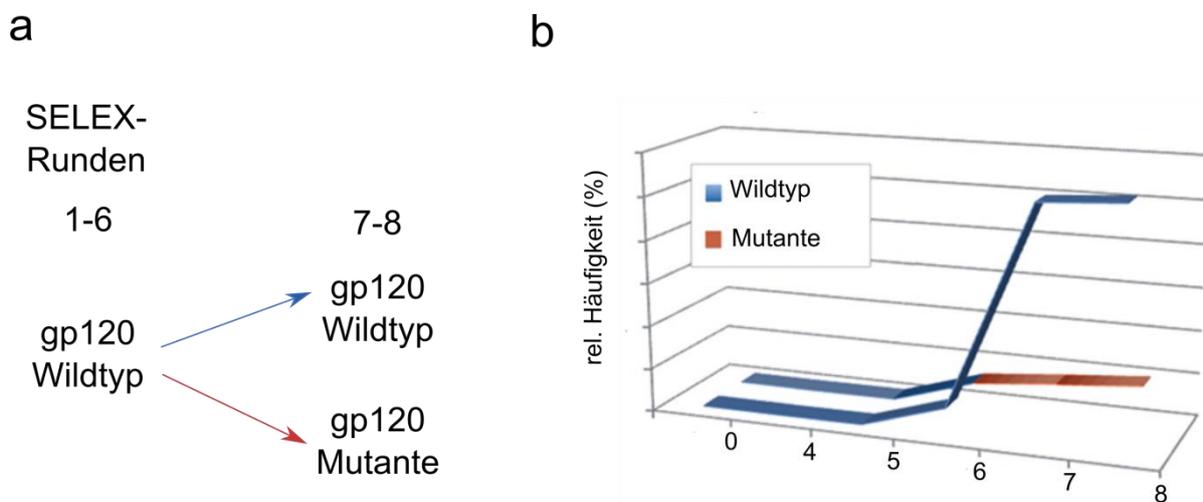


Abbildung 53: Strategie zur Identifikation von Aptameren für ein bestimmtes Protein Epitop. Nach der 6. Selektionsrunde erfolgte die Teilung der SELEX. Dabei erfolgten zwei weitere Runden mit einer Mutante bzw. dem Wildtypprotein. Mittels *in silico tracing* konnte dann das Aptamer MP1-4 entdeckt werden, dass nur in der SELEX mit dem Wildtypprotein stark angereichert worden ist (Abbildung von Blind *et al.*¹⁰⁰).

Die mit der Methode verbundenen hohen Kosten sowie der höhere bioinformatische Aufwand schlossen allerdings das *Next Generation Sequencing* zur Charakterisierung der Bibliothek aus.

6.2 Charakterisierung bindender Nukleinsäuren

Die Identifikation bindender Nukleinsäuren erfolgte zunächst durchflusszytometrisch unter Verwendung von PC-3-Zellen. Dabei zeigte sich eine stärkere Anreicherung bindender Spezies in Runde 12. Da auch die Bibliothek aus Runde 12 stärker an die PC-3 Zellen gebunden hatte, war dies zu erwarten.

Als beste bindende Nukleinsäure stellte sich die nc1228 heraus, während z.B. die nc1217 gar keine Bindung an die Zellen zeigte. Dabei könnte es sich um eine Matrix-bindende Nukleinsäure handeln. Dieses Phänomen kann häufig in einer SELEX auftreten; so zeigten z.B. Mittelberger *et al.*, dass ihre am häufigsten vorkommende Sequenzfamilie keine Bindung an ihr Zielmolekül aufweist.⁴⁶ Auffällig war die bessere Amplifikationsrate von nc1217 in der PCR, die auf eine höhere Anreicherung der Nukleinsäure während der PCR hindeuten könnte und so unter Umständen deren Auftreten in der angereicherten Bibliothek erklären könnte.

Die Zielstellung dieser Arbeit lag in der Selektion von inhibierenden Nukleinsäuren. Es wurde deshalb zunächst versucht mittels FACS den Integrin-inhibierenden Antikörper durch bindende Nukleinsäuren zu verdrängen. Somit hätte die Bindungsstelle am Integrin identifiziert und auch Rückschlüsse auf eine mögliche Inhibition gezogen werden können. Allerdings war keine der getesteten Nukleinsäuren in der Lage, den Integrin-inhibierenden Antikörper signifikant zu verdrängen. Dies könnte daran liegen, dass entweder die Nukleinsäuren an einer anderen Stelle am Integrin binden oder sie nicht affin genug sind, um den Antikörper von seinem Epitop quantitativ zu verdrängen. Da die nc1236 als einzige für einen schwachen Rückgang der Antikörperbindung sorgte, wurde sie neben dem Aptamer mit der höchsten Affinität, der nc1228, für den anschließenden Inhibitionsassay berücksichtigt. Dabei zeigte nicht wie erwartet die 1236 eine Inhibition der Laminin-Integrin-Interaktion, sondern die Nukleinsäure 1228. Die Bestimmung der Inhibitionskonstante führte zu einem Wert von 123 ± 44 nM. Der IC_{50} -Wert liegt bei 150 nM.

Einen ähnlichen IC_{50} -Wert zeigt z.B. CLN0003_SL1, ein DNA-Aptamer, das die durch HGF-induzierte Aktivierung des c-Met Proteins inhibiert.¹⁰¹ Allerdings besitzen alle Aptamere in klinischen Studien IC_{50} -Werte im niedrigen nanomolaren bis picomolaren Bereich. Zum Beispiel inhibiert das NOX-H94 die Ferritin-Expression mit einem IC_{50} -Wert von 20 nM,⁷⁴ während das Aptamer BAX 499 sogar einen Wert von 900 pM aufweist.¹⁰² Zudem zeigten Hussain *et al.* die Variabilität des IC_{50} -Wertes in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltypes. Sie konstruierten eine Chimäre aus einem $\alpha V\beta 3$ Integrin-Aptamer und einer siRNA, die den *eukaryotic elongation factor 2* als Ziel hat. Diese Chimäre inhibierte die Zellproliferation von U-87 MG-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 708 nM, die PC-3-Zellen aber nur mit 1.5 μ M.¹⁰³ Dies zeigt, dass sich auch der IC_{50} -Wert von IDA bei aggressiveren Krebsarten, die mehr Integrin präsentieren, gegeben falls noch verbessern könnte. Trotzdem wäre eine Verbesserung der Inhibitionskonstante für eine Anwendung *in vivo* von Vorteil.

6.3 Weitere Charakterisierung von $\alpha 6\beta 4$ Integrin spezifischen Aptameren

Die Dissoziationskonstante von IDA gegenüber PC-3-Zellen lag bei 137 ± 22 nM. Dies lag in der gleichen Größenordnung wie die Inhibitionskonstante und der IC_{50} -Wert. Dies muss jedoch nicht immer der Fall sein. So besitzt das NOX-H94 einen K_d , der mit 0.65 ± 0.06 nM geringer als der IC_{50} -Wert mit 19.8 ± 4.6 nM ist.⁷⁴ Das CLN0003-SL1-Aptamer dagegen besitzt wie IDA eine Dissoziationskonstante im mittleren nanomolaren Bereich.¹⁰¹ Einen exemplarischen Überblick über gängige Affinitäten von Aptameren mit therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Angabe der Dissoziationskonstanten bereits selektierter Aptamere mit ihrem Zielmolekül und ihrer therapeutischen Anwendung.

Zielmolekül	Dissoziationskonstante [nM]	Therapeutische Anwendung
Angiopoietin 2	2.2	Behandlung der Angiogenese ¹⁰⁴
HER3 (ERBB3)	45	Inhibition der Tumorentwicklung ¹⁰⁵
Nociceptin	300	Schmerztherapie ¹⁰⁶
Phospholipase A ₂	1.7	Behandlung von ARDS, sowie bei septischem Schock ¹⁰⁷
Prostata-spezifische Membran Antigen	$K_i = 2.1$	Behandlung aggressiver Prostataerkrankungen ¹⁰⁸
P-Selektin	0.04	Inhibition viraler Adhäsion ¹⁰⁹
$\alpha v\beta 3$ Integrin	2	Inhibition der Tumorentwicklung ¹¹⁰
$\beta 2$ Integrin-Lymphozyt Funktions-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1)	500	Inhibition der Tumorentwicklung, Entzündungsreaktionen ¹¹¹

Diskussion

Dabei reichen die Dissoziationskonstanten vom höheren nanomolaren Bereich bis in den mittleren picomolaren Bereich.⁷⁶ Ein geringerer K_d ist generell jedoch wünschenswert, da er für eine hohe Affinität steht. So haben z.B. Biesecker *et al.* eine zweite SELEX durchgeführt, um die Dissoziationskonstante ihres C5 bindenden Aptamers zu verbessern. Dazu wurde das Aptamer chemisch so synthetisiert, dass 0.67% den tatsächlichen Basen an der jeweiligen Stellen entsprachen, während der restliche Prozentsatz beliebig aus den jeweiligen anderen Basen zusammengesetzt war. Durch diese Selektionsmethode konnten die Dissoziationskonstante von 20-40 nM auf 2-5 nM gesenkt werden.⁷⁰

Neben der Affinität eines Aptamers spielt die Spezifität eine ebenso große Rolle. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte IDA eine geringere Bindung an PC-3- β 4-Integrin-*Knockdown*- als an normale PC-3-Zellen. Da die Bindung nicht vollständig zurückgegangen war, könnte die Möglichkeit bestehen, dass das Aptamer neben dem α 6 β 4 auch an das α 6 β 1 Integrin band. Dabei zeigten schon Dowling *et al.*, dass ein *Knockdown* der β 4-Integrin-Untereinheit gleichzeitig zu einem Rückgang des α 6 Integrins führt. Das überschüssige α 6 assembliert dann nicht stattdessen mit der β 1-Untereinheit.²³ Somit könnte die Reduktion der Aptamerbindung tatsächlich auf eine geringere Menge der α 6-Untereinheit auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein.

Um nun festzustellen, ob IDA tatsächlich nur an die α 6 Integrin-Untereinheit band, wurde ein Bindungstest mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt. Dieser zeigte dann sowohl Bindung an das α 6 β 4 Integrin als auch an α 6 β 1, aber nicht an das α 4 β 1. Da die β 1- und die β 4-Untereinheit nur eine 38 % Sequenzidentität aufweisen, lagen die Ergebnisse der durchgeführten Bindungstests nahe, dass das Aptamer die α 6 Integrin-Untereinheit band.¹¹² Da das α 6 zu anderen α -Integrinen nur eine Sequenzidentität von 18-26% aufweist und eine Bindung an das α 4 nicht nachgewiesen werden konnte, ist von einer hochspezifischen Bindung durch IDA auszugehen.^{113,114}

Neben den humanen Proteinen wurde auch eine Bindung an das murine α 6 β 4 Integrin festgestellt. Dies war insofern zu erwarten, da die schwere Kette des murinen α 6 Integrins der X1 Isoform eine Sequenzidentität von 92-93% zum humanen α 6 Integrin besitzt und das murine β 4 Integrin 87-92% der korrespondierenden Aminosäurepositionen des humanen Integrins teilt.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Studien zeigten, dass sich in den meisten Krebszellen das α 6 Integrin bevorzugt mit dem β 4 zusammenlagert. Dementsprechend sollte eine exklusive Bindung von α 6 Integrinen durch

IDA keine negativen Auswirkungen auf eine spezifische Behandlung der Metastasierung von Krebszellen aufweisen.¹¹⁷ Zudem zeigten Hoshino *et al.*, dass neben dem $\alpha6\beta4$ Integrin auch das $\alpha6\beta1$ an der organotropen Metastasierung in die Lunge beteiligt ist. Somit könnte mit dem $\alpha6$ Integrin spezifischen Aptamer IDA die gleichzeitige Blockierung zweier Laminin-bindender Integrine erfolgen.

Die Analyse der Bindung von IDA an andere Zelloberflächenproteine zeigte neben der spezifischen Bindung an Integrin auch eine leichte unspezifische Bindung an E-Selektin. Da ein E-Selektin-spezifisches DNA-Aptamer, genannt SDA-2, die gleichen Primerregionen wie IDA besitzt, wurde in einem anschließenden Filterretentionsassay sowohl die Bindung von SDA-2 als auch von IDA, dessen verkürzte Varianten ohne Primerregionen und der Kontroll-DNA an E-Selektin überprüft. Dieser Assay ergab eine um die dreifach höhere E-Selektin-Bindung der Kontroll-DNA sowie SDA-2 als bei IDA. Zudem zeigte sich noch, dass die verkürzten Varianten von IDA ohne Primerregionen keine Bindung mehr zum E-Selektin aufwiesen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die 10%ige Bindung von IDA an E-Selektin durch unspezifische Wechselwirkungen der Primerbereiche mit dem Protein verursacht wurde. Da die Kontroll-DNA das E-Selektin ebenfalls sehr stark gebunden hatte, konnte zudem davon ausgegangen, dass die verwendete E-Selektin-Charge längere Nukleinsäuren oder bestimmte, in den Primerregionen enthaltene Motive bindet.

Da bei Krebszellen häufig eine Re-Lokalisation des Integrins auf der Zelloberfläche mittels Internalisierung erfolgt, sollte im Folgenden analysiert werden, ob das Aptamer IDA ebenfalls in die Zellen gelangt. Dabei ist literaturbekannt, dass das $\alpha6\beta4$ Integrin Caveolin-1- sowie Rab5- und Rab11-vermittelt von den Zellen internalisiert wird.¹¹⁸ Innerhalb von fünf Minuten erfolgt bereits die Endozytose mittels Rab5, während nach 20 Minuten die Internalisierung mittels Rab11 dominiert.¹¹⁸ Abbildung 54 zeigt schematisch die Internalisierungswege des Integrins.

Diskussion

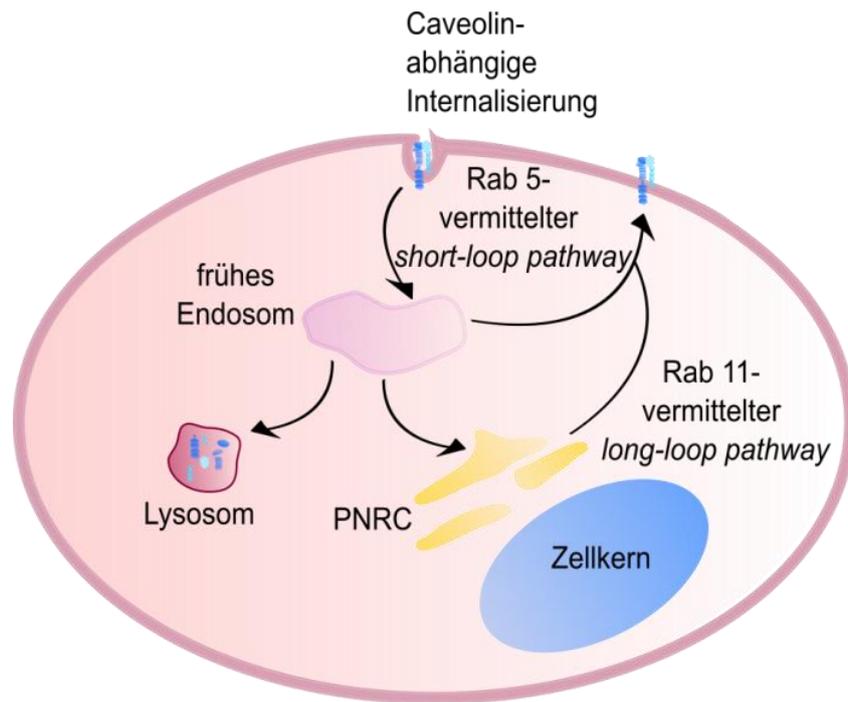


Abbildung 54: Das $\alpha 6 \beta 4$ Integrinrecycling erfolgt über zwei räumlich sowie zeitlich getrennte Wege. Zum einen erfolgt sehr schnell das Rab-5-vermittelte Recycling durch den *short-loop pathway*. Zum anderen gelangt das $\alpha 6 \beta 4$ Integrin zunächst Rab11-vermittelt in das perinukleare Recyclingkompartiment (PNRC). Dort angekommen kann z.B. die Degradation eines gebundenen Liganden erfolgen, während das Integrin aufgrund seiner hohen Stabilität intakt bleibt. Anschließend wird das Integrin wieder zurück auf die Zelloberfläche gebracht. Beide Recyclingwege sorgen so für einen ständigen Nachschub an Integrinen, um für eine erneute Adhäsion an die extrazelluläre Matrix gewappnet zu sein. (Abbildung modifiziert nach De Franceschi *et al.* ¹¹⁹)

Die Analyse von Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen zeigte, dass sowohl der $\beta 4$ -Integrin-Antikörper als auch IDA in die PC-3-Zellen aufgenommen wurden. Dabei verteilte sich das Aptamer mehr im Cytosol in Form von Vesikeln als im Zellkern. Dies entspricht auch den Erwartungen der Integrin-Internalisierung. Für eine genauere Lokalisierung von IDA müssten allerdings weitere Experimente unternommen werden. Durch eine Co-Lokalisation mit einem Rab5- sowie Rab11-Antikörper könnte so der Aptamerverbleib genauer ermittelt werden.

Des Weiteren wurde die Effizienz dieser Internalisierung mittels FACS-Analysen gezeigt. Dabei wurden bereits nach 10 min 98% des Aptamers internalisiert (Abb.38). Aufgrund dessen sollte geklärt werden, ob IDA in der Lage ist, die Integrin Internalisierung direkt zu induzieren. Dazu wurde das Aptamer fünf, zehn und 15 Minuten mit den PC-3-Zellen inkubiert, um eine Internalisierung des Integrins mit dem Aptamer zu gewährleisten. Ein Rückgang der Integrin-Präsentation, der für eine Aptamer induzierte Internalisierung sprechen würde, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass das Integrin über den kurzen bzw. langen Internalisierungsweg bereits wieder an die Zelloberfläche

gelangt war. Um zu verhindern, dass neu produziertes Integrin auf der Zelloberfläche präsentiert wird, könnte in einem weiteren Experiment Nocodazol, welches eine Fragmentierung des Golgi-Apparates auslöst, eingesetzt werden.¹²⁰ Somit könnte kein neu produziertes Integrin auf die Zelloberfläche gelangen.

Für eine Anwendung *in vivo* spielt allerdings die Stabilität des Aptamers eine wichtige Rolle. Dabei zeigte sich in RPMI für IDA eine Halbwertszeit von 24 Stunden, die allerdings bei Zugabe von 10% FKS auf eine Stunde reduziert wurde. Dies lag an ubiquitär in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden Exo- und Endonukleasen. Die Halbwertszeit von IDA in murinem Blutplasma lag bei sechs Stunden. Diese Erhöhung der Halbwertszeit deutet darauf hin, dass im verwendeten Plasma weniger DNasen als im Serum vorhanden waren. Im Allgemeinen liegen die Halbwertszeiten von unmodifizierten DNA-Aptameren in der hier beobachteten Größenordnung. So besitzt z.B. SDA eine Halbwertszeit von etwa 90 min in Zellkulturmedium mit 10% FKS.⁸⁹

Die Analyse der Struktur erfolgte mittels CD-Spektroskopie. Die Differenz der Absorption von links oder rechts zirkular polarisiertem Licht wird durch optisch aktive, chirale Moleküle detektiert. Durch Änderung der Amplitude lassen sich so Sekundärstrukturen wie z.B. A-, B- und Z-DNA unterscheiden.^{90,91} Zudem lassen sich auch Stammschleifen aus B- DNA oder Quadruplexe voneinander unterscheiden. Die charakteristischen Kurvenverläufe beider Struktur motive zeigt Abbildung 55.

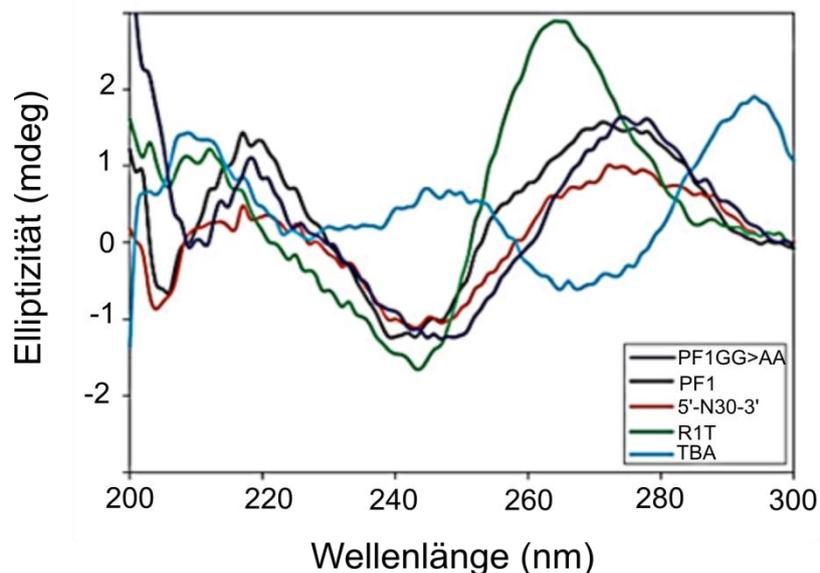


Abbildung 55: CD-spektroskopische Untersuchung der Struktur verschiedener Nukleinsäuren im Vergleich. Durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima und Minima lassen sich G-Quadruplexe (TBA, antiparallel und R1T, parallel) von B-Form DNA (PF1GG>AA, PF1 und 5'-N₃₀-3') unterscheiden (Abbildung von Lai *et al.* ¹²¹)

Die CD-spektroskopische Analyse ergab unabhängig von verschiedenen Salzen ein positives Maximum bei 219 nm, ein Minimum bei 248 nm sowie ein Maximum bei 276 nm. Dies entsprach einer charakteristischen B-DNA-Stammschleife, ähnlich wie z.B. bei PF1 (Abb. 55, violett).¹²¹

Dabei zeigte die Sekundärstrukturvorhersage für IDA drei Stammschleifen.⁹² Da es für RNA eine größere Datenbank an Sekundärstrukturen gibt, mit denen die Sequenzen verglichen werden können, können die Algorithmen der Sekundärstrukturvorhersage viel leichter getestet werden, als bei DNA, von der es weniger Strukturdaten gibt.¹²² Deshalb sind die Strukturvorhersagen von RNA häufig genauer als die für DNA. Zudem werden Tertiärstrukturen wie z.B. Pseudoknoten nicht berücksichtigt. Dennoch ließen sich mit dieser Methode zwei Verkürzungen ableiten. Diese banden an die PC-3-Zellen, konnten die Interaktion mit Laminin-332 aber nicht mehr inhibieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Aptamer nicht direkt, sondern benachbart zu der Laminin-332-Integrin-Bindestelle bindet. Somit könnte nur das lange, ursprünglichen Aptamer aufgrund seiner Größe in die Bindungsstelle hineinragen und diese maskieren. Die verkürzten Aptamervarianten wären in diesem Szenario zu klein, um die Bindestelle abzudecken.

Um auszuschließen, dass ein anderes Faltungsmotiv dazu führte, dass die kurzen Aptamere nicht mehr inhibieren, wurde IDA-B mittels CD-Spektroskopie analysiert. Dabei zeigte das kurze Aptamer die gleichen Minima und Maxima wie IDA, lediglich die Amplitude war kleiner. Dies könnte daran liegen, dass IDA-B nur zwei mögliche Stammschleifen aufweist, während IDA drei besitzt.

6.4 Postselektive Modifikation von IDA

In vivo werden Aptamere an ihrem Phosphatrückgrat schnell von Serumnukleasen bzw. Exonukleasen degradiert, wodurch sie eine geringere Halbwertszeit im Körper aufweisen können als z.B. Antikörper. Zur Verbesserung der Stabilität und Pharmakokinetik lassen sich sowohl prä- als auch postselektive Modifikationen vornehmen. Dabei lassen sich sowohl die Zucker, als auch das Phosphatrückgrat und die Basen modifizieren.¹²³ King *et al.* berichteten 2002 von der Selektion von Phosphorothioat-Aptameren, welche neben einer hohen Nuklease-Resistenz auch noch eine hohe Affinität aufwiesen. Aufgrund der Tatsache, dass das Thio-modifizierte Phosphatrückgrat weniger bevorzugt harte Kationen bindet, liegt es

häufig als blankes Anion vor. Dies kann somit zu einer höheren Affinität von modifizierten Aptameren für positivgeladene Proteine führen.¹²³ Abbildung 56 zeigt dabei das natürliche Rückgrat im Vergleich zum Thio-modifizierten.

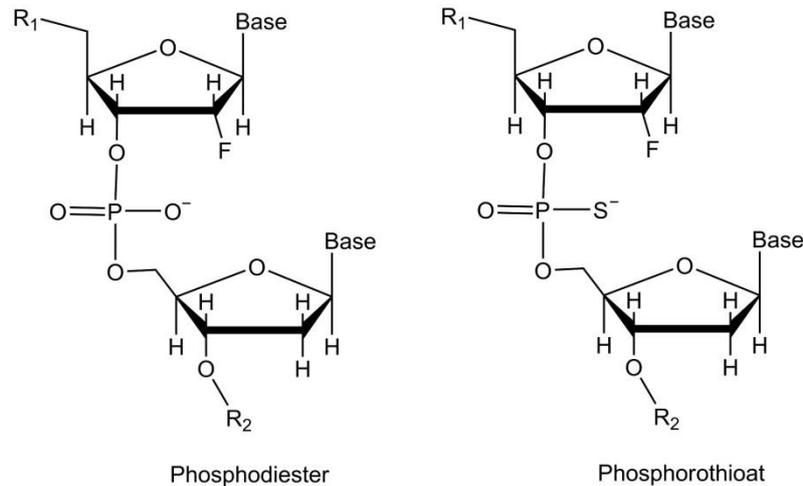


Abbildung 56: Darstellung des Phosphodiesters (rechts) im Vergleich zum Phosphorothioat (links).

Um nun sowohl die Stabilität als auch die Affinität von IDA zu erhöhen, erfolgte der Ersatz aller dAMPs durch Verwendung von 2'-Deoxyadenosin-5'-O-(1-thiotriphosphat) bei der enzymatischen Synthese. Leider führte der Austausch aller dAMPs gegen die Thio-modifizierte Variante zu einem vollständigen Verlust der Bindung. Dies könnte daran gelegen haben, dass eines oder mehrere der 12 dAMPs an der Bindung zum Integrin beteiligt sind oder aber wichtige strukturelle Funktionen besitzen. Eine Ursache könnte sein, dass der Schwefel einen größeren Van der Waals-Radius besitzt und somit der Torsionswinkel des Phosphatrückgrates verändert wurde. Dies könnte dann zu einer Fehlfaltung des Aptamers geführt haben.^{123,124} Meyer *et al.* zeigten, dass eine postselektive Modifikation häufig zu einem Verlust der Bindung führt.⁹⁸ Deshalb müsste zunächst geklärt werden, welche Basen an der Bindung des Aptamers an das Integrin beteiligt sind. Daraufhin könnten gezielt die entsprechenden Basen modifiziert werden.

Neben der intramolekularen Thio-Modifikation zur Erhöhung der Aptamer-Stabilität erfolgte ebenfalls eine PEGylierung des Aptamers am 3'-Ende mittels EDC/NHS-Kopplung. Da IDA eine Größe von 24 kDa besitzt, würde das Aptamer *in vivo* sehr schnell durch renale Filtration ausgeschieden werden. Die Untergrenze für die renale Retention von Makromolekülen liegt zwischen 30 und 50 kDa, wobei allerdings auch die Ladung des Moleküls eine Rolle spielt.¹²⁵ Studien konnten zeigen, dass unkonjugierte Aptamere in der Maus eine Zirkulationshalbwertszeit von nur 5-10 Minuten besaßen, während die Konjugation eines

40 kDa Polyethylenglykols (PEG) an das Aptamer, zu einer verlängerter Zirkulation von über einem Tag führte.¹²⁵

Bei den hier beschriebenen Experimenten war die PEGylierung des Aptamers erfolgreich. Allerdings zeigte die durchflusszytometrische Analyse, dass die Bindung des modifizierten Aptamers an PC-3-Zellen um 43% sank. Da allerdings auch die PEGylierte Kontroll-DNA eine reduzierte Hintergrundbindung an die Zellen aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass die PEGylierung nur zu einer verminderten unspezifischen Bindung führte und die Funktion des Aptamers erhalten blieb. Da in diesem Fall die Erhöhung der Masse nur um etwa 1.2 kDa erfolgte, müsste in weiteren Experimenten die Kopplung des PEG mit höherer Masse erfolgen. Da der verwendete Methyl-PEG-NHS-Ester nicht mit größeren PEG-Einheiten zu kaufen ist, müsste das PEGylierte Aptamer direkt käuflich erworben werden.

6.5 Aptamer-vermitteltes Einschleusen von miRNA

Für eine effektive Behandlung von Krebserkrankungen ist häufig eine multiple Therapie verschiedener Zielmoleküle vonnöten. Neben der Inhibition der Integrin-Laminin-Interaktion könnte deshalb durch das Einschleusen von miRNA, die Expression tumorfördernder Gene herunterreguliert werden, die ebenfalls für die Metastasierung der Krebszellen eine entscheidende Rolle spielen. Da miRNA nur partiell komplementär zu ihren Zielmolekülen sind, liegt der Vorteil von miRNA gegenüber siRNA darin, dass sie in der Lage ist, die Expression einer ganzen Reihe von Zielmolekülen zu unterbinden. Da diese Ziele häufig im gleichen zellulären Kontext zu finden sind, könnten sich so ganze Phänotypen verändern.¹²⁶ Als "*Proof of Principle*" wurde die mikroRNA-29A gewählt. Diese verringert die Expression des $\beta 4$ Integrins. Somit müsste nach Aptamer-vermitteltem Transport dieser miRNA die Präsentation des Integrins verringert werden. Rohde *et al.* zeigten, dass der Aptamer-vermittelte Transport von prä-miRNA zu einer effektiveren Inhibition der Expression von Zielmolekülen führte als der Transport der reifen miRNA. Somit sollte die prä-miRNA-29A an das Aptamer IDA gekoppelt werden.

Für die Konstruktion der Aptamer-mi/siRNA-Chimären sind in der Literatur bereits verschiedene Ansätze beschrieben. Abbildung 57 zeigt zwei der gängigen Methoden.

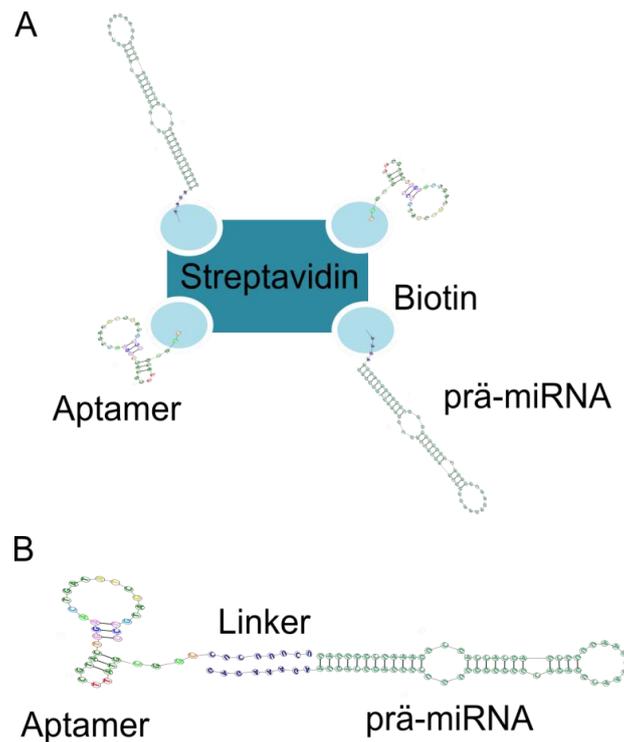


Abbildung 57: Vorgehensweisen zur nicht-kovalenten Kopplung von Aptameren und prä-miRNA. Die Kopplung des Aptamers mit der prä-miRNA erfolgt über Biotin-Streptavidin-Bindung (A) bzw. per Hybridisierung an einen Linker (B; Abbildung von Zhou *et al.*).⁹⁶

Die Biotinylierung sowohl der prä-miRNA als auch des Aptamers und die anschließende Kopplung beider über Biotin-Streptavidin stellt eine sehr einfache Methode der Kopplung dar (Abb. 57 A). Da die miRNA allerdings selbst enzymatisch hergestellt werden sollte, war eine Biotinylierung nicht möglich. Deshalb wurde die zweite Methode der Kopplung gewählt, in der beide Oligonukleotide über einen Linker hybridisiert werden (B). Für eine verbesserte T7-Transkription wurde die prä-miRNA um eine Leadersequenz verlängert. Dieser „Leader“ sollte dann auch direkt dazu verwendet werden, um die RNA mit dem Aptamer zu verbinden. Dafür wurde das Aptamer mit einem um die revers-komplementäre RNA-Sequenz verlängerten Linker versehen.

Um sicherzustellen, dass die ergänzten Nukleotide keinen Einfluss auf die Faltung der prä-miRNA hatten, erfolgten Sekundärstrukturvorhersagen. Diese zeigten keine Auswirkung auf die Faltung des Aptamers.

Die Funktionalität des prä-miRNA-Konstruktes wurde zunächst durch dessen Transfektion in PC-3-Zellen überprüft. Diese erfolgte mittels Lipofectamin. Nach 24 h wurde die Integrin-Präsentation durchflusszytometrisch analysiert. Wie erwartet, zeigten nur die mit miRNA transfizierten Zellen einen Rückgang der Integrine auf der Zelloberfläche. Da allerdings nur eine Teilpopulation der PC-3-Zellen einen Rückgang aufwies, müsste in nächsten

Diskussion

Experimenten, sowohl die Zeit als auch die prä-miRNA-Konzentration erhöht oder die Zellen entsprechend ihrer Populationen getrennt werden.

7. Ausblick

Die Selektion eines Aptamers zur Inhibition der $\alpha 6\beta 4$ Integrin-Laminin-332-Interaktion war erfolgreich. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob das Aptamer diese Interaktion auch *in vivo* blockieren kann und somit eine Metastasierung von Krebszellen unterbindet. Allerdings fördern durch Integrin-Laminin-Interaktionen ausgelöste Signalkaskaden, zusätzlich zur Metastasierung, die Proliferation, das Überleben, sowie die Invasion von Tumoren. Somit müsste in einem nächsten Schritt herausgefunden werden, ob das Integrin-spezifische DNA-Aptamer IDA das Auslösen dieser Signalkaskaden verhindern kann. So zeigten z.B. Gabarra *et al.*, dass $\beta 4$ Integrin-inhibierende Antikörper in der Lage sind, die durch Adhäsion an Laminin aktivierte PI3K-AKT-Signalkaskade zu inhibieren. Dazu analysierten sie die Menge an phosphoryliertem AKT (Serin/Threonin-Kinase) von Zellen bei Zugabe von Laminin mit und ohne Antikörpern mittels Western Blot.⁹⁴ Diese Analyse könnte ebenfalls mit IDA durchgeführt werden, um herauszufinden, ob das Aptamer eine Inhibition der Aktivierung dieser Signalkaskade aufweist. Studien von Tobias Lange (UKE) zeigten allerdings, dass der $\beta 4$ -Integrin-*Knockdown* bei PC-3-Zellen keinen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung hat. Lediglich HER2 war signifikant reduziert. Somit könnte entweder der Aptamer-Einfluss auf die HER2 Aktivität analysiert werden oder es müsste, ähnlich wie bei Gabarra *et al.* eine Brustkrebszelllinie verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung könnte auch die Messung der Aktivität der PI3K mittels Kinase-Assay darstellen.²⁹ Neben diesem Signalweg könnte auch die Phosphorylierung des Integrins bei Zugabe von Laminin mit und ohne IDA beobachtet werden. Dies würde direkt zeigen, ob das Aptamer die, durch Bindung an Laminin ausgelöste, Phosphorylierung des Integrins unterbindet. Somit würde ein globalerer Überblick über eine mögliche Auslösung aller Signalkaskaden erhalten werden.

Zusätzlich zu den Signalwegen könnte ebenfalls die Proliferation der Krebszellen direkt analysiert werden. Schon 2002 zeigten Dajee *et al.*, dass das Tumorstadium sowohl von Laminin-5 (Laminin-332) als auch vom $\alpha 6\beta 4$ Integrin abhängt.¹²⁷ Dabei waren humane Keratinozyten, die entweder Laminin-5 oder $\beta 4$ Integrin nicht produzieren konnten, auch nicht in der Lage invasive Tumore zu bilden. Bei Re-Expression der entsprechenden Gene war auch die Tumorbildung wieder zu erkennen.^{127,128} Zusätzlich zeigten z.B. Gabarra *et al.*, dass ihr $\alpha 6\beta 4$ Integrin-inhibierender Antikörper in der Lage ist, sogar das adhäsionsunabhängige Tumorstadium zu unterbinden.⁹⁴ Somit müsste analysiert werden, ob IDA ebenfalls sowohl die Bildung von Tumoren als auch das Tumorstadium inhibieren kann.

Dazu könnte das Wachstum einer 3D-Kultur mit und ohne IDA bzw. auch mit und ohne Laminin beobachtet werden. Sollte IDA sowohl die Signalkaskaden als auch die Tumorbildung sowie deren Proliferation inhibieren können, könnten weiterführende *in vivo* Studien durchgeführt werden.

Zudem konnten Hoshino *et al.* zeigen, dass $\alpha 6\beta 4$ Integrin-präsentierende Exosomen eine gerichtete Metastasierung des Primärtumors in die Lunge vorbereiten.³⁹ Exosomen sind kleine Vesikel, die in den verschiedensten Körperflüssigkeiten, z.B. im Serum und Plasma, vorkommen. Sie werden von verschiedenen Zelltypen sekretiert und entstehen in Endosomen.¹²⁹ Nach der Freisetzung ins extrazelluläre Milieu können sie an Zielzellen andocken. Daraufhin verschmelzen sie entweder mit der Plasmamembran oder werden endozytiert.

Exosomen beinhalten eine hohe Anzahl an Membran- sowie cytosolischen Proteinen, aber keine aus den Mitochondrien, dem Zellkern oder dem endoplasmatischen Retikulum. Neben den Proteinen besitzen sie auch zusätzlich eine ganze Reihe an kodierender und nicht-kodierender RNA, die nach Auflösung der Exosomen in der Zielzelle freigesetzt werden. Dabei lassen sich Exosomen aus Krebszellen leicht durch ihr Proteinprofil von Exosomen aus gesunden Zellen unterscheiden.¹²⁹ Somit wäre die Detektion von $\alpha 6\beta 4$ Integrin-präsentierenden Exosomen für die Diagnostik von Metastasen von entscheidender Bedeutung.

Es könnte dafür mittels IDA ein Schnelltest entwickelt werden, der diese Integrin-präsentierenden Exosomen in den verschiedenen Körperflüssigkeiten detektieren kann. Insgesamt wurde schon eine ganze Reihe an sowohl optischen als auch elektrochemischen Aptasensoren entwickelt.¹³⁰ Zum Beispiel nutzen Chen *et al.* Aptamer-gekoppelte Förster-Resonanzenergietransfer-fähige Nanopartikel zur Detektion verschiedener Krebsarten.^{130,131} Enteshari Najafabadi *et al.* dagegen extrahierten mit Aptamer-gekoppelten magnetischen Nanopartikeln Adenosin aus dem Urin von Lungenkrebspatienten und analysierten dies mittels Elektronenspray-Ionenmobilitäts-Spektrometrie.¹³² Somit könnte auch IDA an magnetische Partikel gekoppelt werden, um die $\alpha 6\beta 4$ Integrin-präsentierenden Exosomen zu extrahieren sowie zu detektieren. Neben der Kopplung an Nanopartikel wäre es aber auch möglich, das Aptamer mit einem Fluorophor sowie ein Antisense-Oligonukleotid mit einem Quencher zu versehen. Dabei wird der Fluorophor nur bei Bindung ans Zielmolekül nicht mehr gequencht, da das Antisense-Oligonukleotid verdrängt wird. Diesen Ansatz führten Tang *et al.* erfolgreich sowohl zur Detektion von ATP als auch von Thrombin durch.¹³³

Ausblick

Da IDA von den Zellen internalisiert wird, könnte das Aptamer auch gezielt als Wirkstofftransporter eingesetzt werden. Dabei könnten Aptamere direkt z.B. an Chemotherapeutika, Toxine und auch si/miRNA gekoppelt werden, oder auch indirekt über Nanopartikel. So könnten z.B. Aptamer-miRNA-Chimären genutzt werden, um gezielt andere Zelladhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren zu regulieren oder auch durch den Einsatz der let7-miRNA für die Apoptose von Krebszellen zu sorgen. Allerdings müsste zunächst ermittelt werden, in welchen Kompartimenten IDA nach der Internalisierung verbleibt. Da bisher nur festgestellt werden konnte, dass IDA vesikulär in den Zellen vorliegt, müsste geklärt werden, ob eine IDA-miRNA-Chimäre nicht direkt in den Lysosomen degradiert werden würde. Dies könnte durch Co-Lokalisation mit Rab11-Antikörpern erfolgen.

Für einen Einsatz *in vivo* müsste allerdings die Stabilität und Affinität von IDA verbessert werden. Da eine Thio-Modifikation von dAMP innerhalb des Aptamers zu einem Verlust der Bindung führte, sollte in nächsten Experimenten herausgefunden werden, welche Nukleotide für die Bindung an das Integrin bedeutend sind. Dies könnte z.B. mittels Structure Probing erfolgen.

Sollte dies keinen Erfolg bringen, müssten Varianten von IDA erstellt werden, bei der jeweils eine Base ausgetauscht worden ist. Die Untersuchung der Bindung und der Inhibition dieser Varianten könnten dann gezielt auf Basen hinweisen, die an der Bindung beteiligt sind bzw. auf Basen, die austauschbar sind.

Eine andere Möglichkeit IDA zu stabilisieren und dessen Affinität zu erhöhen, wurde eine weitere SELEX nach der Methode von Biesecker *et al.* bieten.⁷⁰

Neben der Modifikation des Aptamers zur Erhöhung der Affinität wäre auch eine Dimerisierung mit der ebenfalls an die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit bindende Nukleinsäure nc1236 möglich. Da beide an unterschiedliche Stellen des Integrins binden, würde ein bivalentes Aptamer erzeugt werden. Schwierigkeiten bereiten könnte dabei aber die Kalkulation der benötigten Linkerlänge, die den optimalen Abstand beider Aptamere gewährleistet. Dafür wäre eine Untersuchung der Bindungsstelle am Integrin sowohl der nc1236 als auch von IDA von Vorteil.

Diese Bindungsstellenanalyse wäre auch wichtig für eine weitere Untersuchung der Spezifität des Aptamers. So müsste in einem nächsten Schritt analysiert werden, ob IDA durch seine $\alpha 6$ -Integrin-Spezifität auch die Adhäsion an andere Laminine unterbinden kann.

Ausblick

Zudem zeigten King *et al.*, dass bei Prostatakrebspatienten zusätzlich zur Metastasierung zahlreiche Knochenerkrankungen aufgrund der Spaltung der $\alpha 6$ Integrin-Untereinheit auftreten.¹³⁴ Somit wäre auch festzustellen, ob IDA in der Lage ist, die durch eine Urokinase verursachte Spaltung der $\alpha 6$ -Untereinheit des Integrins zu verhindern.

8. Literaturverzeichnis

1. Srichai, M. B. & Zent, R. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer, Integrin structures and function*. (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-0814-8
2. Hynes, R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
3. Burke, R. D. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int. Rev. Cytol.* **191**, 257–84 (1999).
4. Anthis, N. J. & Campbell, I. D. The tail of integrin activation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 191–8 (2011).
5. Nisticò, P., Di Modugno, F., Spada, S. & Bissell, M. J. $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Res.* **16**, 459 (2014).
6. Xiong, J.-P. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha V\beta 3$. *Science (80-.)*. **294**, 339–345 (2001).
7. Campbell, I. D. & Humphries, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
8. Shimaoka, M. & Springer, T. a. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 703–16 (2003).
9. Margadant, C., Monsuur, H. N., Norman, J. C. & Sonnenberg, A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 607–14 (2011).
10. Wang, F. *et al.* The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 13447–13462 (2013).
11. Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* **119**, 3901–3903 (2006).
12. Miyazaki, K. Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer Sci.* **97**, 91–98 (2006).
13. Marinkovich, M. P. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 370–380 (2007).
14. Givant-Horwitz, V., Davidson, B. & Reich, R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett.* **223**, 1–10 (2005).
15. Yamada, M. & Sekiguchi, K. in *Basement Membr.* (Jeffrey H. Miner) 197–229 (Elsevier Inc, 2015). doi:10.1016/bs.ctm.2015.07.002
16. Stewart, R. L. & O'Connor, K. L. Clinical significance of the integrin $\alpha 6\beta 4$ in human malignancies. *Lab. Investig.* **95**, 976–986 (2015).
17. Giancotti, F. G. Targeting integrin $\beta 4$ for cancer and anti-angiogenic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 506–11 (2007).
18. Winograd-Katz, S. E., Fässler, R., Geiger, B. & Legate, K. R. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 273–88 (2014).
19. Margadant, C., Frijns, E., Wilhelmsen, K. & Sonnenberg, A. Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 589–96 (2008).

Literaturverzeichnis

20. Litjens, S. H. M., de Pereda, J. M. & Sonnenberg, A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol.* **16**, 376–83 (2006).
21. Jones, J. C., Hopkinson, S. B. & Goldfinger, L. E. Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* **20**, 488–94 (1998).
22. Borradori, L. & Sonnenberg, a. Structure and function of hemidesmosomes: More than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 411–418 (1999).
23. Dowling, J., Yu, Q. C. & Fuchs, E. $\beta 4$ Integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* **134**, 559–572 (1996).
24. O'Connor, K. L., Shaw, L. M. & Mercurio, A. M. Release of cAMP gating by the $\alpha 6\beta 4$ integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J Cell Biol* **143**, 1749–1760 (1998).
25. Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 816–26 (2004).
26. Nikolopoulos, S. N., Blaikie, P., Yoshioka, T., Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin $\beta 4$ signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **6**, 471–483 (2004).
27. Rabinovitz, I., Toker, A. & Mercurio, A. M. Protein kinase C-dependent mobilization of the $\alpha 6\beta 4$ integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **146**, 1147–60 (1999).
28. O'Connor, K. L. RhoA Function in Lamellae Formation and Migration Is Regulated by the $\alpha 6\beta 4$ Integrin and cAMP Metabolism. *J. Cell Biol.* **148**, 253–258 (2000).
29. Shaw, L. M., Rabinovitz, I., Wang, H. H.-F., Toker, A. & Mercurio, A. M. Activation of Phosphoinositide 3-OH Kinase by the $\alpha 6\beta 4$ Integrin Promotes Carcinoma Invasion. *Cell* **91**, 949–960 (1997).
30. Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y. & Giancotti, F. G. The intracellular functions of $\alpha 6\beta 4$ integrin are regulated by EGF. *J. Cell Biol.* **134**, 241–53 (1996).
31. Guo, W. *et al.* Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* **126**, 489–502 (2006).
32. O'Connor, K. L., Chen, M. & Towers, L. N. Integrin $\alpha 6\beta 4$ cooperates with LPA signaling to stimulate Rac through AKAP-Lbc-mediated RhoA activation. *AJP Cell Physiol.* **302**, C605–C614 (2012).
33. Mainiero, F. *et al.* The coupling of $\alpha 6\beta 4$ integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J.* **16**, 2365–75 (1997).
34. Bachelder, R. E. *et al.* p53 inhibits $\alpha 6\beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell Biol.* **147**, 1063–72 (1999).
35. Chen, M., Sinha, M., Luxon, B. A., Bresnick, A. R. & O'Connor, K. L. Integrin $\alpha 6\beta 4$ Controls the Expression of Genes Associated with Cell Motility, Invasion, and Metastasis, Including S100A4/Metastasin. *J. Biol. Chem.* **284**, 1484–1494 (2008).
36. Cruz-Monserrate, Z., Qiu, S., Evers, B. M. & O'Connor, K. L. Upregulation and redistribution of integrin $\alpha 6\beta 4$ expression occurs at an early stage in pancreatic adenocarcinoma progression. *Mod. Pathol.* **20**, 656–667 (2007).

37. Sroka, I. C. *et al.* Schwann Cells Increase Prostate and Pancreatic Tumor Cell Invasion Using Laminin Binding A6 Integrin. *J. Cell. Biochem.* n/a–n/a (2015). doi:10.1002/jcb.25300
38. Vay, C. *et al.* Integrin Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Loss of the Physiological Integrin Expression Pattern Correlates with Disease Progression. *PLoS One* **9**, e109026 (2014).
39. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
40. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467–8 (1990).
41. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (80-.)*. **249**, 505–510 (1990).
42. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
43. Sun, H. & Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* **20**, 11959–11980 (2015).
44. Wu, W.-H. *et al.* Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 658 (2012).
45. Li, J., Sun, M., Wei, X., Zhang, L. & Zhang, Y. An electrochemical aptamer biosensor based on ‘gate-controlled’ effect using β -cyclodextrin for ultra-sensitive detection of trace mercury. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 423–426 (2015).
46. Mittelberger, F. *et al.* RAID3 - An interleukin-6 receptor-binding aptamer with post-selective modification-resistant affinity. *RNA Biol.* **12**, 1043–1053 (2015).
47. Lupold, S., Hicke, B., Lin, Y. & Coffey, D. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* **62**, 4029–4033 (2002).
48. Meyer, C., Hahn, U. & Rentmeister, A. Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *J. Nucleic Acids*, 904750 (2011).
49. Xiang, D. *et al.* Superior Performance of Aptamer in Tumor Penetration over Antibody: Implication of Aptamer-Based Theranostics in Solid Tumors. *Theranostics* **5**, 1083–1097 (2015).
50. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. & Ruml, T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161 (2015).
51. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 83–91 (2005).
52. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 20–21 (2004).
53. Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O’Donoghue, M. B. & Tan, W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat. Protoc.* **5**, 1169–85 (2010).
54. Mayer, G. *et al.* Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell

- mixtures. *Nat. Protoc.* **5**, 1993–2004 (2010).
55. Wang, Y. *et al.* DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
 56. Li, W.-M. *et al.* Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. *Biomaterials* **35**, 6998–7007 (2014).
 57. Thiel, W. H. *et al.* in (Sioud, M.) **1218**, 187–199 (Springer New York, 2015).
 58. Meyer, S. *et al.* Development of an efficient targeted cell-SELEX procedure for DNA aptamer reagents. *PLoS One* **8**, e71798 (2013).
 59. 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).
 60. White, R. Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using ‘Toggle’ SELEX. *Mol. Ther.* **4**, 567–573 (2001).
 61. Anandhakumar, C., Kizaki, S., Bando, T., Pandian, G. N. & Sugiyama, H. Advancing Small-Molecule-Based Chemical Biology with Next-Generation Sequencing Technologies. *ChemBioChem* **16**, 20–38 (2015).
 62. Dupont, D. M., Larsen, N., Jensen, J. K., Andreasen, P. a. & Kjems, J. Characterisation of aptamer–target interactions by branched selection and high-throughput sequencing of SELEX pools. *Nucleic Acids Res.* gkv700 (2015). doi:10.1093/nar/gkv700
 63. Hosseini, M., Khabbaz, H., Dadmehr, M., Ganjali, M. R. & Mohamadnejad, J. Aptamer-based Colorimetric and Chemiluminescence Detection of Aflatoxin B1 in Foods Samples. *Acta Chim. Slov.* **62**, 721–8 (2015).
 64. Liu, L., Zhou, X. & Shi, H. Portable optical aptasensor for rapid detection of mycotoxin with a reversible ligand-grafted biosensing surface. *Biosens. Bioelectron.* **72**, 300–305 (2015).
 65. Reinemann, C. & Strehlitz, B. Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med. Wkly.* **144**, w13908 (2014).
 66. Zhao, N., You, J., Zeng, Z., Li, C. & Zu, Y. An Ultra pH-Sensitive and Aptamer-Equipped Nanoscale Drug-Delivery System for Selective Killing of Tumor Cells. *Small* **9**, 3477–3484 (2013).
 67. Dai, F., Zhang, Y., Zhu, X., Shan, N. & Chen, Y. Anticancer role of MUC1 aptamer–miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of PTEN methylation. *Target. Oncol.* **7**, 217–225 (2012).
 68. Lao, Y., Phua, K. K. L. & Leong, K. W. Aptamer Nanomedicine for Cancer Therapeutics : Barriers and Potential for Translation. 2235–2254 (2015).
 69. Green, L. S. *et al.* Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. *Biochemistry* **35**, 14413–14424 (1996).
 70. Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K. & Bendele, R. a. Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* **42**, 219–230 (1999).
 71. Rusconi, C. P. *et al.* RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **419**, 90–94 (2002).
 72. Bates, P. J., Laber, D. a., Miller, D. M., Thomas, S. D. & Trent, J. O. Discovery and

- development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 151–164 (2009).
73. 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).
74. Schwoebel, F. *et al.* The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood* **121**, 2311–2315 (2013).
75. Kulkarni, O. *et al.* Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2350–2358 (2007).
76. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 537–50 (2010).
77. Keefe, A. D. & Cload, S. T. SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 448–56 (2008).
78. Raines, R. T. Ribonuclease A. *Chem. Rev* **98**, 1045–1065 (1998).
79. Mayer, G. The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 2672–89 (2009).
80. Elle, I. C. *et al.* Selection of LNA-containing DNA aptamers against recombinant human CD73. *Mol. BioSyst.* **11**, 1260–1270 (2015).
81. Jørgensen, A. S., Hansen, L. H., Vester, B. & Wengel, J. Improvement of a streptavidin-binding aptamer by LNA- and α -l-LNA-substitutions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 2273–7 (2014).
82. Taylor, A. I. & Holliger, P. Directed evolution of artificial enzymes (XNAzymes) from diverse repertoires of synthetic genetic polymers. *Nat. Protoc.* **10**, 1625–1642 (2015).
83. Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S. & Hirao, I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotechnol.* **31**, 453–7 (2013).
84. Diafa, S. & Hollenstein, M. Generation of Aptamers with an Expanded Chemical Repertoire. *Molecules* **20**, 16643–16671 (2015).
85. Ozer, A., Pagano, J. M. & Lis, J. T. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e183 (2014).
86. 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).
87. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
88. Bailey, T. L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–W208 (2009).
89. Faryammanesh, R. *et al.* SDA, a DNA Aptamer Inhibiting E- and P-Selectin Mediated Adhesion of Cancer and Leukemia Cells, the First and Pivotal Step in Transendothelial Migration during Metastasis Formation. *PLoS One* **9**, e93173 (2014).
90. Kypr, J., Kejnovská, I., Renčíuk, D. & Vorlíčková, M. Circular dichroism and

- conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1713–1725 (2009).
91. Chang, Y.-M., Chen, C. K.-M. & Hou, M.-H. Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3394–3413 (2012).
 92. Reuter, J. S. & Mathews, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 129 (2010).
 93. Chen, W., Harbeck, M. C., Zhang, W. & Jacobson, J. R. MicroRNA regulation of integrins. *Transl. Res.* **162**, 133–143 (2013).
 94. Gabarra, V. *et al.* Antibodies directed to alpha6beta4 highlight the adhesive and signaling functions of the integrin in breast cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.* **9**, 437–45 (2010).
 95. Egles, C. *et al.* Integrin-Blocking antibodies delay Keratinocyte Re-Epithelialization in a Human three-dimensional wound healing model. *PLoS One* **5**, 2–9 (2010).
 96. Zhou, J. & Rossi, J. J. Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e169 (2014).
 97. Tai, S. *et al.* PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* **71**, 1668–1679 (2011).
 98. Meyer, C. *et al.* Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers. *RNA Biol.* **11**, 1–9 (2014).
 99. Srisawat, C. & Engelke, D. R. Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* **7**, 632–641 (2001).
 100. Blind, M. & Blank, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol. Ther. Acids* **4**, e223 (2015).
 101. Ueki, R. & Sando, S. A DNA aptamer to c-Met inhibits cancer cell migration. *Chem. Commun.* **50**, 13131–13134 (2014).
 102. Waters, E. K. *et al.* Aptamer BAX 499 mediates inhibition of tissue factor pathway inhibitor via interaction with multiple domains of the protein. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1137–1145 (2013).
 103. Hussain, A. F., Tur, M. K. & Barth, S. An aptamer-siRNA chimera silences the eukaryotic elongation factor 2 gene and induces apoptosis in cancers expressing $\alpha\beta 3$ integrin. *Nucleic Acid Ther.* **23**, 203–12 (2013).
 104. White, R. R. *et al.* Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5028–5033 (2003).
 105. Chen, C.-H. B., Chernis, G. a, Hoang, V. Q. & Landgraf, R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9226–31 (2003).
 106. Faulhammer, D. *et al.* Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ. *RNA* **10**, 516–27 (2004).
 107. Bridonneau, P. *et al.* High-affinity aptamers selectively inhibit human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (hnps-PLA2). *J. Med. Chem.* **41**, 778–786 (1998).

108. Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y. & Coffey, D. S. Identification and Characterization of Nuclease-stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res.* **62**, 4029–4033 (2002).
109. Jenison, R. D., Jennings, S. D., Walker, D. W., Bargatze, R. F. & Parma, D. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**, 265–79 (1998).
110. Mi, J. *et al.* Targeted inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 956–963 (2005).
111. Blind, M., Kolanus, W. & Famulok, M. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3606–10 (1999).
112. Suzuki, S. & Naitoh, Y. Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* **9**, 757–63 (1990).
113. Tamura, R. N. Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J. Cell Biol.* **111**, 1593–1604 (1990).
114. Hogervorst, F., Kuikman, I., von dem Borne, A. E. & Sonnenberg, A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* **9**, 765–770 (1990).
115. Kennel, S. J. *et al.* Sequence of a cDNA encoding the beta 4 subunit of murine integrin. *Gene* **130**, 209–16 (1993).
116. Jay, B. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* *Br. J. Ophthalmol.* **62**, (1978).
117. Gaietta, G., Redelmeier, T. E., Jackson, M. R., Tamura, R. N. & Quaranta, V. Quantitative measurement of alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrin internalization under cross-linking conditions: a possible role for alpha 6 cytoplasmic domains. *J. Cell Sci.* **107** Pt 1, 3339–3349 (1994).
118. Seltmann, K., Cheng, F., Wiche, G., Eriksson, J. E. & Magin, T. M. Keratins Stabilize Hemidesmosomes Through Regulation of $\beta 4$ -Integrin Turnover. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1609–1620 (2015).
119. Franceschi, N. De, Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P. & Ivaska, J. Integrin traffic – the update. *J Cell Sci.* **128**, 839–852 (2015).
120. Minin, a a. Dispersal of Golgi apparatus in nocodazole-treated fibroblasts is a kinesin-driven process. *J. Cell Sci.* **110** Pt 1, 2495–505 (1997).
121. Lai, Y.-T. & DeStefano, J. J. DNA aptamers to human immunodeficiency virus reverse transcriptase selected by a primer-free SELEX method: characterization and comparison with other aptamers. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 162–76 (2012).
122. SantaLucia, J. & Hicks, D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 415–40 (2004).
123. King, D. J. *et al.* Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF- κ B RelA(p65) and p50. *Biochemistry* **41**, 9696–9706 (2002).
124. Yuce, M., Ullah, N. & Budak, H. Trends in Aptamer Selection Methods and Applications. *Analyst* 5379–5399 (2015).

Literaturverzeichnis

125. Lee, J. W., Kim, H. J. & Heo, K. Therapeutic aptamers : developmental potential as anticancer drugs. **48**, 234–237 (2015).
126. Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. & Leung, S. W. S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. Acids* **4**, e252 (2015).
127. Dajee, M. *et al.* NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* **421**, 639–43 (2003).
128. Lipscomb, E. a *et al.* The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. *Cancer Res.* **65**, 10970–10976 (2005).
129. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
130. Wu, X., Chen, J., Wu, M. & Zhao, J. X. Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy. *Theranostics* **5**, 322–344 (2015).
131. Chen, X. *et al.* Using aptamer-conjugated fluorescence resonance energy transfer nanoparticles for multiplexed cancer cell monitoring. *Anal. Chem.* **81**, 7009–14 (2009).
132. Najafabadi, M. E., Khayamian, T. & Hashemian, Z. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles for extraction of adenosine from urine followed by electrospray ion mobility spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **107**, 244–250 (2015).
133. Tang, Z. *et al.* Aptamer switch probe based on intramolecular displacement. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11268–11269 (2008).
134. King, T. E. *et al.* The role of alpha 6 integrin in prostate cancer migration and bone pain in a novel xenograft model. *PLoS One* **3**, (2008).

9. 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

Katharina Berg

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Ulrich Hahn für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas für meine Doktorarbeit, für seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht und für seine nützlichen Tipps in der Vorbereitung von Vorträgen und Geduld beim Einreichen von Manuskripten bedanken.

Bei Prof. Dr. Chris Meier möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ich danke auch Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Prof. Dr. Stefan Rose-John, Dr. Inken Lorenzen und Dr. Stefan Düsterhöft von der Universität Kiel für die Zusammenarbeit und ihre Geduld bei der Selektion von Aptameren für die membran-proximale Domäne des ADAM-17.

Mein besonderer Dank geht auch an meine Kooperationspartner am Universitätsklinikum Eppendorf Prof. Dr. Tobias Lange, Hanna Maar und Prof. Dr. Udo Schumacher.

Ich bedanke mich auch bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, der AG Rentmeister sowie der AG Ignatova für die schöne Zeit und die freundliche Aufnahme. Vor allem bei Dr. Katrin Seelhorst möchte ich mich für die Korrektur meiner Doktorarbeit, die schönen Stunden bei einer Tasse Tee und ihr offenes Ohr für alle sich ergebenden Hindernisse bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Florian Mittelberger für die immer entspannte und gute Labornachbarschaft, die Korrektur meiner Doktorarbeit sowie für die sehr guten und hilfreichen Ratschläge bei allen wissenschaftlichen Fragen. Ich möchte mich auch bei Kristina Szameit für die hilfreichen Doktorandenrunden sowie die schöne gemeinsame Doktorandenzeit bedanken. Dr. Eileen Magbanua möchte ich danken für ihre Unterstützung bei meinen Projekten, für die Korrektur meiner Doktorarbeit sowie für ihre Aufmunterungen. Bei Sarah Lemcke möchte ich mich für die Hilfe bei den CD-spektroskopischen Messungen bedanken.

Auch bei meinen Praktikanten Manuela, Sonja, Francesco und Kim sowie meinen BTA-Schülern Julian, Jasper, Eleonore, Daria, Nathan, Jaqueline und Ibrahim möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Verlobten Tobias Redder, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

11. Anhang

11.1 Sequenzen

Tabelle 20: Durch die Sequenzierung erhaltene Sequenzen ohne die Primerbereiche.

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
101	CCCACCTTCTCCTTATCGTTCTGTGTTCCGCCGTGCC
102	CACTCATAGGAAGAGGGCCCTCTGTTGATCATCCCCCGC
103	CTTCCTTCGAGTCCGGGATAACCCTGGTATCTGGTCGG
104	CCGTACCGTTACCATACGTCCCTAGTTGC
1010	TTGACTAACTGCTCTAGACCTGCTCAATGTCTTGTCGC
125	CCAAGACGCTTATCGTCCCCCACTGCTTTTGTGTGTGC
128	TTTGGGTCTTATTATCTCGCCTTCTTCCGCTGTACCGGG
1210	TTGATTCGTCTTCCATCCAATGTCCTCTCCTGCTATCCC
1215	CGGGGTTGACGGTAATGATATAATGTCCCGACCATGTGG
1216	CACCTCCTGTCTTACTGCAACCCTACATTGGCAGGTGTC
1217	CTTGTCGACGTGGGATTGCTCGTGCTGTTATGTTGTGTC
1218	CATTAGCCCCATTAGTGTGTCCAATCTCCTACGGTCCC
1225	CCTGATCATTGTGTTTCGTGATACCCATCCCCCTATCGTC
1228	CGTGCGTATTCGTACTGGAAGTATCGATGTCCC
1232	GCATGGTGTTATCCCTAATTCCCTCGGTACCCTGGTGAC
1236	CACCGTCATGTCCGTATTGTACCGTTGAGATTCCCACGG
1241	GTCCTGCGGTTTAAATGTCTTCTGCTAGCTATTCCCTTGTC
1245	GTCCTCGGATTACTGCTGTGTGGTACCTTTTACCTGGGC

Anhang

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
1247	CTTCCCCTCCACTTATCCTCAATTCGTTGTGTCAGCCGC
1250	TAGTTCCTCCACATTACCCGTTGCCGATGTATCCGCC

11.2 Gefahrstoffe

Die verwendeten Gefahrstoffe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 21: Verwendete Gefahrstoffe.

Stoffname	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	GHS06, GHS08	H350, H340, H361f, H301f, 372, H332, H312, H319, H315, H317	P201, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P308+P313
APS	GHS03, GHS07, GHS08	H272, H302, H315, H319, H334, H335, H317	P280, P305+P351+P338, P302+P352, P304+P341, P342+P311
BCIP	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Bisacrylamid	GHS07	H302	P264, P301+P312, P330
Chloroform	GHS07, GHS08	H351, H302, H373, H315	P302+P352, P314
DTT	GHS07	H302, H315, H319	P302+P352, P305+P351+P338
N,N Dimethylformamid	GHS02, GHS07, GHS08	H360D, H226, H332, H312, H319	P201, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313

Anhang

Stoffname	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
EDC	GHS05, GHS07	H315, H318, H335	P261, P3280, P305+P351+P338
EDTA	GHS07	H319	P305+P351+P338
Essigsäure	GHS02, GHS05	H226, H314	P280, P301+P330+P331, P307+P310, P305+P351+P338
Ethanol	GHS02	H225	P210
Ethanolamin	GHS05, GHS07	H302+H312+H332, H314, H335	P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P310
Ethidiumbromid	GHS06, GHS08	H330, H341, H302, H315, H319, H335	P281, P302+P352, P305+P351+P338, P304+P340, P309, P310
Formaldehyd	GHS05, GHS06, GHS08	H330, H301, H311, H314, H351, H317	P301+P310, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P320, P361, P405, P501
Isoamylalkohol	GHS02, GHS07	H226, H332, H335, EUH066	P261
Isopropanol	GHS02, GHS07	H225, H319, H336	P210, P233, P305+P351+P338
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H331, H311, H301, H370	P210, P233, P280, P302+P352, P309+P310
Natriumazid	GHS06, GHS08, GHS09	H300, H310, H373, H410, EUH032	P237, P280, P301+P310+P330, P302+P352, P310, P391, P501

Anhang

Stoffname	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Natriumhydroxid	GHS05	H314, H290	P280, P301+P330+P331, P309+P310, P305+P351+P338
NBT	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Phenol	GHS05, GHS06, GHS08	H331, H301, H311, H314, H341, H373	P280, P302+P352, P301+P330+P331, P309, P310, P305+P351+P338
Salzsäure, konz.	GHS05, GHS07	H314, H335	P260, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P405, P501
SDS	GHS02, GHS06	H228, H311, H302, H335, H315, H319	P210, P280, P304+P340, P305+P351+P338, P309+P310
Spermidin	GHS05	H314	P280, P305+P351+P338, P313
TEMED	GHS02, GHS05, GHS07	H225, H332, H302, H314	P210, P233, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309+P310
Tris	GHS07	H315, H319, H335	P280, P305+P351+P338, P312
Tris-HCl	GHS07	H315, H319, H335	P280, P302+P352 P305+P351+P338,

Anhang

Stoffname	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Triton X-100	GHS07, GHS09	H302, H319, H411	P273, P280, P301+P312+P330, P337 + P313, P391, P501
Xylencyanol FF	GHS07	H319	P280, P305+P351+P338

11.3 KMR-Stoffe

Die verwendeten KMR-Stoffe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Abbildung 58: Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe.

Cas-Nummer	Stoffname (IUPAC)	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie I oder II
79-06-1	Acrylamid	30-40% wässrige Lösungen zur Polymerisation	K: 1B M: 1B R_F: 2
56-65-5	$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Radioaktive Markierung von RNA	
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/ml wässrige Lösungen zur Färbung von Agarose- und Polyacrylamidgelen (0.5 mg/ml Endkonzentration)	M: 2
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von Dot Blots	R_E: 1B

11.4 Lebenslauf

KATHARINA BERG (M. SC. CHEMIE)

Geboren am 04.11.1987 in Hamburg

BERUFSERFAHRUNG

12/2012-03/2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg

- Betreuung von Studenten und BTA-Schülern
- Biochemie und Molekularbiologie (Spezialgebiet: Nukleinsäuren)
- Zellkultur (FACS, LSM)
- Kinetikmessungen (SPR, MST, EMSA, FRA)
- Umgang mit radioaktiven Stoffen

SCHULE UND STUDIUM

12/2012-03/2016 Doktorandin in der Gruppe von Prof. Dr. Ulrich Hahn, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg

Thema: "Selektion und Charakterisierung eines $\alpha\beta4$ Integrin inhibierenden DNA-Aptamers"

10/2010-10/2012 Master of Science, Chemie, Universität Hamburg, Gesamtnote: 1,7

Abschlussarbeit: "Charakterisierung IL-6R-bindender 2'-F-mod. RNA-Aptamere und Selektion von DNA-Aptameren als Inhibitoren des IL-6R-Komplexes", Note: 1,3.

10/2007-10/2010 Bachelor of Science, Chemie, Universität Hamburg, Gesamtnote: 2,3

Abschlussarbeit: "Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für die Domäne D3 des IL-6-Rezeptors und für das Fusionsprotein Hyper-IL-6", Note: 1,3.

08/1998-06/2007 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Ohmoor, Hamburg, Gesamtnote: 2,4

KENNTNISSE

EDV	Sicherer Umgang mit MS-Office (Word, Excel, Powerpoint) und im Erstellen von Grafiken (OriginPro, ChemDraw, Inkscape, Lightroom)
SPRACHEN	Deutsch (Muttersprache), Englisch (sehr gut), Latein (Latinum)
FAHRERLAUBNIS	Führerschein der Klasse B

PUBLIKATION

K. Berg, T. Lange, F. Mittelberger, U. Schumacher, U. Hahn, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, in press, **2016**.

K. Berg, T. Lange, D. Wicklein, U. Schumacher, U. Hahn, Inhibition der Bindung zwischen dem $\alpha 6\beta 4$ Integrin auf Prostatakrebszellen und rekombinatem Laminin-332 durch das $\alpha 6$ Integrin spezifische DNA-Aptamer IDA, Patent: DE 10 2016 100 039.6

K. Berg, E. Magbanua, U. Hahn, in *Nucleic Acid Aptamers SE - 2* (Ed.: G. Mayer), Springer New York, **2016**, 21–32.

F. Mittelberger, C. Meyer, G. H. Waetzig, M. Zacharias, E. Valentini, D. I. Svergun, K. Berg, I. Lorenzen, J. Grötzinger, S. Rose-John, et al., *RNA Biol.* **2015**, *12*, 1043–1053.

C. Meyer*, K. Berg*, K. Eydeler-Haeder, I. Lorenzen, J. Grötzinger, S. Rose-John, U. Hahn, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 1–9.

*geteilte Erstautorenschaft