

Chemisch modifizierte Aptamere-
Eine Werkzeugkiste der Chemischen Biologie

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Friedrich Falk Rohrbach

aus

Gießen

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Günter Mayer
 2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Famulok
- Tag der Promotion: 23.06.14
Erscheinungsjahr: 2014

“Chemistry is, well technically, chemistry is the study of matter.
But I prefer to see it as the study of change.”

Walter White

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Danksagung	9
1. Zusammenfassung	11
2. Einleitung	13
2.1. Aptamere	15
2.2. Aptamere und der G-Quadruplex	21
2.3. Chemische Modifikationen von Aptameren	25
2.4. Blutgerinnung	31
2.4.1. Die Gerinnungskaskade	31
2.4.2. Inhibitoren des Gerinnungssystems	34
3. Ziel der Arbeit	35
4. Ergebnisse	37
4.1. Lysozym-Apta-Sensor	37
4.1.1. Bindung von Amino-modifiziertem Lysozym-Aptamer	38
4.2. Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen	41
4.2.1. Bindung von HD1-22 und HS02-52G an Zielproteine	43
4.2.2. Bindung von HD1-22 und HS02-52G an Aprotinin	44
4.3. TINAs	45
4.3.1. HD1-TINAs	47
4.3.1.1. Bindung und Koagulationszeit von HD1-i-TINAs	47
4.3.1.2. Bindung und Schmelzpunkte von HD1-r-TINAs	49
4.3.1.3. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie von HD1-r-TINAs	51
4.3.1.4. Koagulationszeit und partielle Thromboplastinzeit von HD1-r-TINAs	52
4.3.1.5. Bindung, Koagulationszeit und partielle Thromboplastinzeit von HD1-22-r-TINAs	54
4.3.2. HD22-TINAs	57
4.3.2.1. Bindung von HD22-Punktmutanten	57
4.3.2.2. Bindung von HD22-TINAs	58
4.3.3. C10.36-TINAs	61
4.3.3.1. Bindung von C10.36-TINAs I	61

4.3.3.2.	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie von C10.36	65
4.3.3.3.	Bindung von C10.36-TINAs II	66
4.4.	LNS	69
4.4.1.	Bindung von HD22-LNS	70
4.5.	Lichtsensible Modifikationen	71
4.5.1.	Azo-HD1	71
4.5.2.	Aptamer-basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES)	73
4.5.2.1.	Bindung von fHD1 und fHD1-T4A	76
4.5.2.2.	Western Blot cross-link	77
4.5.2.3.	Kompetitive Aptamere im cross-link	78
4.5.2.4.	Bead-Aufreinigung des cross-links	80
4.5.2.5.	Hirudin-Test	82
4.5.2.6.	Plasma-Gerinnungstest	84
4.5.2.7.	Fibrillenbildung in Glaskapillaren	86
5.	Diskussion	89
5.1.	Apta-Sensoren	89
5.2.	Strukturstabilisierung und Aktivitätssteigerung von Aptameren	92
5.3.	Lichtsensible Modifikationen	98
6.	Ausblick	103
7.	Methoden	107
7.1.	Konzentrationsmessung von Oligonukleotiden und Proteinen	107
7.2.	Radioaktive ³² P-Phosphorylierung	107
7.3.	Analytisches PAGE Gel	108
7.4.	Filterretention	109
7.5.	Circulardichroismus-Spektroskopie	110
7.6.	Schmelzpunktbestimmung für G-Quadruplex Oligonukleotide	111
7.7.	Koagulationszeit	111
7.8.	Partielle Thromboplastinzeit	112
7.9.	Ausbildung des Komplexes aus ABES und Thrombin	112
7.10.	Amidolytische Aktivität von Thrombin	112
7.11.	Plasma-Gerinnungstest	113
7.12.	Hirudin Testsystem	113
7.13.	Western Blot	113
7.14.	Bead-Aufreinigung	114
7.15.	Mikroskopie von Fibrillenbildung	115

7.16. Zellkultur von Ramos-Zellen	115
7.17. Affinitätsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Ramos-Zellen mittels Durchflusszytometrie	115
7.18. Zellkultur von Michigan Cancer Foundation-7-Zellen	116
7.19. Zellviabilitätstest	117
7.20. Zellkultur von HeLa-Zellen in glukosefreiem Medium.....	117
7.21. Durchflusszytometrie von glmS-eGFP HeLa-Zellen	118
7.22. Pfu-Polymerase-Kettenreaktion.....	119
7.23. <i>In vitro</i> Transkription von Aptameren.....	120
7.24. RNS-Ligation	121
7.25. Phenol-Chloroform Extraktion	121
7.26. Trennung von RNS-Strängen mittels Ionenaustausch-HPLC	122
8. Materialien	123
8.1. Chemikalien.....	123
8.2. Verbrauchsmaterialien.....	125
8.3. Geräte.....	126
9. Anhang	127
9.1. C10.36-TINA zusätzliche Daten	127
9.2. HD22 LNS zusätzliche Daten	129
9.3. Struktur Azo-HD1	130
9.4. Aptamer basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES) zusätzliche Daten	131
9.4.1. Western Blot <i>cross-link</i> Quantifizierung.....	131
9.4.2. Hirudin-Test zusätzliche Daten.....	132
9.4.3. Gerinnungstest zusätzliche Daten	134
9.4.4. Zellviabilitätstest von C10.41	135
9.5. Eine photo-labile Schutzgruppe für M69	137
9.5.1. M69 Punktmutanten	138
9.5.2. RNS-Ligation	140
9.6. Glukosamin-6-Phosphat mit photo-labilen und Acetopropyl-Schutzgruppen.....	143
9.7. Sequenzen	145
9.8. Abkürzungsverzeichnis.....	149
9.9. Literaturverzeichnis	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Aptamere wurden für verschiedenste Bereiche entwickelt.	16
Abbildung 2.	Ein G-Quadruplex besteht aus einer oder mehreren Guanin(G)-Tetraden. Das Aptamer HD1 besitzt einen aus 2 G-Tetraden bestehenden antiparallelen G-Quadruplex.....	21
Abbildung 3.	Nukleinsäuren können auf verschiedenste Arten chemisch modifiziert werden..	26
Abbildung 4.	HD1 mit einer Antisense-Verlängerung, die eine cage-Schutzgruppe trug, konnte durch UV-Bestrahlung inaktiviert werden.....	28
Abbildung 5.	Thrombin ist das zentrale Protein der Hämostase.....	32
Abbildung 6.	Die Protease Thrombin besitzt ein aktives Zentrum und zwei Exosites.....	33
Abbildung 7.	Lysozym-Apta-Sensor mit Amino-modifiziertem Lysozym-Aptamer (APT) auf Carbonsäure-modifizierten mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren zur Quantifizierung von Lysozym.....	37
Abbildung 8.	Lysozym-Aptamer mit 5'-Amino-Modifikation (APT, a-c) band in der Filterretention selektiv an Lysozym, eine randomisierte Kontroll-DNS mit 5'-Amino-Modifikation (d-f) zeigte deutlich weniger Affinität an Lysozym.....	39
Abbildung 9.	Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen ermöglichte die Quantifizierung der katalytischen Aktivität von Proteinen aus komplexen Matrizen.	42
Abbildung 10.	Argatroban hatte keinen Einfluss auf die Bindung von HD1-22 mit und ohne Biotinylierung an Thrombin. Aprotinin steigerte das Affinitäts-Signal von HS02-52G mit und ohne Biotinylierung an APC.....	43
Abbildung 11.	HD1-22 und HS02-52G mit und ohne Biotinylierung banden an Aprotinin.	44
Abbildung 12.	Struktur von interkalierenden Nukleinsäuren und verdrehten interkalierende Nukleinsäuren (TINAs).....	45
Abbildung 13.	TINA-Modifikationen wurden an unterschiedlichen Positionen in die HD1-Sequenz eingeführt.....	47
Abbildung 14.	HD1-i-para-TINAs zeigten erhöhte Affinität zu Thrombin und geringfügige Koagulationszeitverlängerung, HD1-i-ortho-TINAs wiesen geringe Affinität und verkürzte Koagulationszeit im Vergleich zu unmodifiziertem HD1 auf.....	48
Abbildung 15.	r-para-TINA- und r-Amany-Modifikationen an Position 8 in HD1 verbesserten die Affinität an Thrombin.....	50

Abbildung 16.	r-TINA-Modifikationen an Position 8 in HD1 bildeten einen antiparallelen G-Quadruplex ähnlich zu unmodifiziertem HD1.....	51
Abbildung 17.	r-TINA-Modifikation an Position 8 in HD1 verbesserten dessen gerinnungshemmende Eigenschaften.....	53
Abbildung 18.	HD1-22-r8P zeigte eine hohe Affinität zu Thrombin und verlängerte Koagulations- und partiellen Thromboplastinzeiten im Vergleich zu HD1-22.....	54
Abbildung 19.	Die Mutationen C15T und A16T beeinflussten nicht die Affinität des HD22 Aptamers.....	57
Abbildung 20.	HD22 bildet nach Tasset et al. einen zweilagigen parallelen G-Quadruplex.....	58
Abbildung 21.	TINA-Modifikationen in HD22 führten zu einem Verlust der Bindungseigenschaft von HD22 zu Thrombin.	59
Abbildung 22.	C10.36 kann, abgeleitet von seiner Sequenz, eine antiparallele G-Quadruplex-Struktur ausbilden.....	62
Abbildung 23.	Das Signal der Inkubation von C10.36 mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer zeigte nicht den Charakter einer Sättigungsfunktion.	63
Abbildung 24.	Position 25 in C10.36 tolerierte eine TINA-Modifikation.	64
Abbildung 25.	C10.36 sowie C10.36-deltaT14 bildeten einen parallelen G-Quadruplex, C10.36-G24A zeigte beeinträchtigte, aber noch vorhandene parallele G-Quadruplex-Struktur.	65
Abbildung 26.	C10.36 kann, abgeleitet aus den Daten der CD-Spektroskopie, eine parallele G-Quadruplex-Struktur ausbilden.....	67
Abbildung 27.	C10.36 mit para-TINA(P)-Modifikation an Position 25 zeigte vergleichbare Konkurrenzseigenschaften wie Wildtyp-C10.36.	68
Abbildung 28.	Die LNS Modifikationen.	69
Abbildung 29.	Die LNS Modifikationen HD22-r3alphaT, HD22-r3IT und HD22-r28IC beeinflussten die Affinität zu Thrombin nur geringfügig.	70
Abbildung 30.	Azo-HD1 erreichte nach Beleuchtung mit UV-Licht $\lambda = 365$ nm nicht die Affinität von HD1 zu Thrombin.....	72
Abbildung 31.	Herstellung des Komplexes aus Aptamer basierter Epitop-Schutzgruppe (ABES) und Thrombin.....	74
Abbildung 32.	Photo-Spaltung des Komplexes aus Aptamer basierter Epitop-Schutzgruppe und Thrombin.	75
Abbildung 33.	HD1 und fHD1 hatten eine vergleichbare Affinität zu Thrombin, die Punktmutanten HD1-T4A und fHD1-T4A zeigten bis 1000 nM keine Bindung an Thrombin.	76
Abbildung 34.	fHD1, funktionalisiert mit sulfo-EGS, bildete einen kovalenten Komplex mit der schweren Seitenkette von Thrombin. Die Punktmutante fHD1-T4A, funktionalisiert	

	mit sulfo-EGS, reagierte ebenfalls mit Thrombin, aber in geringerem Ausmaß.	77
Abbildung 35.	fHD1 bildete Komplexe mit Exosite I und Exosite II. Eine Konkurrenz um die Bindungsstelle konkurrierenden Aptameren konnte die Komplexbildung steuern.	79
Abbildung 36.	fHD1-T4A bildete hauptsächlich einen Komplex mit Exosite II. Eine Konkurrenz um die Bindungsstelle konkurrierenden Aptameren konnte die Komplexbildung steuern.	80
Abbildung 37.	Thrombin in der Reaktionslösung, das keinen <i>cross-link</i> mit fHD1 bildete, konnte nicht mit HD1-bio beschichteten <i>beads</i> aus der Reaktionslösung entfernt werden.	81
Abbildung 38.	Der Hirudin-Test untersuchte die Blockierung der Exosite I im ABES- <i>cross-link</i>	82
Abbildung 39.	Der fHD1 <i>cross-link</i> verhinderte die Hirudin-abhängige Inhibition der amidolytischen Aktivität von Thrombin.	83
Abbildung 40.	Thrombin mit fHD1-ABES zeigte eine vollständige Gerinnungsinhibition. Die Gerinnungsaktivität konnte durch Spaltung der photo-labilen Schutzgruppe wieder hergestellt werden.	85
Abbildung 41.	Mittels der fHD1-ABES an Thrombin konnte ein Fibrin-Gerinnel orts- und zeitaufgelöst in einer Glaskapillare dargestellt werden.	86
Abbildung 42.	HD22 besitzt laut seiner Kristallstruktur einen pseudo-G-Quadruplex.	94
Abbildung 43.	Die Strukturinformationen zu einem Aptamer sind entscheidend für den Erfolg einer chemischen Modifikation.	96
Abbildung 44.	Koinkubation mit einigen C10.36-TINA-Modifikationen erhöht das Fluoreszenzsignal des Wildtyp-Aptamers.	127
Abbildung 45.	Das Fluoreszenzsignal von C10.36-G24A wird durch C10.36-TINA Modifikationen nicht erhöht.	128
Abbildung 46.	HD22-r28alphaC hat eine niedrigere Affinität an Thrombin als das Wildtyp-Aptamer.	129
Abbildung 47.	Die Azo-Gruppe in Azo-HD1 ersetzte die Basen der TGT-Schleife von Position 7 bis 9.	130
Abbildung 48.	fHD1 bildete mit Thrombin im Western Blot eine intensivere <i>cross-link</i> -Bande als fHD1-T4A.	131
Abbildung 49.	Der fHD1 <i>cross-link</i> verhinderte die Hirudin-abhängige Inhibition der amidolytischen Aktivität von Thrombin in Abhängigkeit der Hirudinkonzentration.	132
Abbildung 50.	Weitere Datenpunkte des Hirudin-Tests.	133
Abbildung 51.	Weitere Datenpunkte des Plasma-Gerinnungstests.	134
Abbildung 52.	C10.41 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität verglichen mit der C10.41-C15T-Mutante.	136

Abbildung 53.	Die Struktur von M69 wird durch eine Mutation an Position 34 grundlegend verändert.	138
Abbildung 54.	Die M69 Punktmutanten M69-G34A und M69-C35T haben im Vergleich zu Wildtyp-M69 eine niedrigere Affinität an die Cytohesin1Sec7 Domäne.	139
Abbildung 55.	Die Ligation von M69 kann durch unterschiedliche Ligationsstrategien erfolgen.	140
Abbildung 56.	Bei beiden Ligationen (45_46 und 37_38) entstand ein Ligationsprodukt, welches sich mittels Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (IE-HPLC) von den Ausgangsprodukten abtrennen ließ. t.	141
Abbildung 57.	M69 war nach der Ligation und der HPLC-Aufreinigung funktional.	142
Abbildung 58.	Die mRNS wurde durch das glmS-Ribozym (<i>glmS-riboswitch</i> , rot) nach Entschützung von GluN6P-caged (cGlcN6P) gespalten.	143
Abbildung 59.	Lichtaktiviertes Glukosamin-6-Phosphat-caged hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von glmS-eGFP-HeLa-Zellen in der Durchflusszytometrie.	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Die Affinitätsbestimmungen und die Schmelzkurven wiesen eine Korrelation auf.	50
Tabelle 2.	Pipettierschema 10 prozentiges analytisches PAGE Gel	108
Tabelle 3.	Konzentrationen Protein/Kompetitor in der Filterretention	110
Tabelle 4.	Pipettierschema 10 prozentiges SDS-PAGE Gel I.	114
Tabelle 5.	Lyse-Puffer-Zusammensetzung Zellviabilitätstest	117
Tabelle 6.	Pipettierschema Pfu-PCR.	119
Tabelle 7.	Bedingungen für die Zyklen der Pfu-PCR.	120
Tabelle 8.	Pipettierschema <i>in vitro</i> Transkription.	120
Tabelle 9.	Programm IE-HPLC	122

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe vieler Menschen zustande gekommen, denen ich zu tiefstem Dank verpflichtet bin.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Günter Mayer nennen, der durch meine Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe der Vielzahl an Projekten und Kooperationen, in denen ich mich entfalten konnte, und sein Engagement meine Promotion überhaupt erst möglich gemacht hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Famulok und Herrn Prof. Dr. Bernd Pötzsch für ihren Einsatz, die Übernahme der Gutachten und die uneingeschränkte Nutzung der Ausrüstung ihrer Arbeitsgruppen, ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Thiele als fachnahes Mitglied meiner Prüfungskommission.

Die Gerinnungsstudien waren nur durch die Unterstützung des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Bernd Pötzsch möglich. Besonders PD Dr. Jens Müller stand mir mit Rat und Tat zur Seite und erlaubte mir einen Einblick in die klinische Routinediagnostik. Seine Begeisterung hat meinen Horizont erweitert. Tina Kupper hat mir nicht nur die technischen Kniffe der Aktivitätsstudien für Gerinnungsproteine gezeigt, vielmehr hat sie dafür gesorgt, dass ich als vollwertiges Mitglied in der Arbeitsgruppe aufgenommen wurde.

Von Prof. Dr. Alexander Heckel habe ich ebenfalls umfassende Unterstützung erhalten und möchte mich bei ihm und seiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Ohne Florian Schäfer und Manuela Fichte wäre das ABES-Projekt nicht zu bewerkstelligen gewesen. Doch nicht nur fachlich, sondern auch menschlich waren meine Arbeitstage in Frankfurt sehr bereichernd.

Meinen Kooperationspartnern in Odense (Dänemark), Herrn Erik Bjerregaard Pedersen, Herrn Per Trolle Jørgensen und Herrn Prof. Dr. Jesper Wengel danke ich für die verlässliche und ergebnisreiche Kooperation. Daneben fühle ich mich auch meinen türkischen Kooperationspartnern in Izmir, Frau Prof. Dr. Arzum Erdem Gursan und Hakan Karadeniz, zum Dank verpflichtet, auch hier war die Kooperation äußerst angenehm und erfolgreich.

In den Arbeitskreisen Mayer und Famulok habe ich nicht nur liebenswürdige, zuverlässige und integre Mitarbeiter, sondern Freunde gefunden. An diesem Punkt möchte ich allen Mitarbeitern beider Arbeitskreise danken. Besonders Dr. Jan Vinkenborg hat mich durch seinen unerschütterlichen Optimismus bleibend geprägt. Doch auch Mohammed Hussein, Finn Lohmann, Dr. Christina Lünse, Dr. Björn Niebel, Katia Schöler, Fabian Tolle, Ben Weiche und Bernhard Wulffen haben einen positiven Einfluss sowohl auf meinen fachlichen als auch persönlichen Werdegang gehabt.

Zu außerordentlichem Dank bin ich Dr. Christine Wosnitza verpflichtet, deren Motivationstalent der Erstellung dieser Arbeit sehr zuträglich war. Artur Kessler und Benjamin Meyer haben mich als "externe Vernunft" immer wieder auf den Boden der Tatsachen geholt und die Dinge ins rechte Licht gerückt, was mir oft

Danksagung

geholfen hat. Nicht nur in sportlichen Fragen hatte Peter Udelhoven als mein Trainer immer ein offenes Ohr für mich, dafür möchte ich ihm danken. Laura Günster hat immer an mich geglaubt und ebenfalls zum positiven Ausgang dieser Arbeit beigetragen.

Zuletzt, dafür am meisten, möchte ich meine Eltern hervorheben, die jede Entscheidung in meinem Lebensweg nicht nur akzeptiert, sondern mich immer unterstützt haben. Sie waren immer für mich da, dafür danke ich ihnen sehr.

1. Zusammenfassung

In der klinischen Diagnostik besteht ein großes Interesse an verlässlichen Systemen zur kostengünstigen Quantifizierung von Biomarkern. Im Falle eines Enzyms als Zielmolekül ist neben der Messung der Menge auch die Bestimmung der katalytischen Aktivität von Belang. Zur Bewältigung dieser Aufgabe können Protein-bindende Oligonukleotide, sogenannte Aptamere, und deren chemische Modifikation beitragen.

Diese Arbeit zeigt, dass die mit Biotin-Gruppen versehenen Aptamere HD1-22-bio und HS02-52G-bio ihre Zielproteine Thrombin und aktiviertes Protein C sogar in Gegenwart von Inhibitoren der jeweiligen Enzymfunktion binden. Dieses Ergebnis trug zur Entwicklung des ersten Testsystems für die direkte, Aptamer-basierte Quantifizierung der katalytischen Aktivität von Thrombin aus Patientenproben bei (OLIGOBIND® *Thrombin activity assay*, American Diagnostica).

Um einen sensiblen Sensor zu entwickeln, ist eine möglichst hohe Affinität des bindenden Elements an das Zielmolekül notwendig. Daher wurden im Zuge dieser Dissertation verdrehte interkalierende Nukleinsäuren (*Twisted intercalating nucleic acids*, TINAs) zur Bindungssteigerung in Oligonukleotide eingebaut. Für die Aptamere HD22 und C10.36 konnten keine effektiven TINA-Modifikationen gefunden werden, dafür wurde für C10.36 ein neues Strukturmodell aufgestellt. Das mit TINA-Molekülen chemisch modifizierte HD1-Modul wurde hingegen wirksam in das bivalente Aptamer HD1-22 eingebaut und resultierte in der Reduktion der Bindungskonstante von $1,88 \pm 0,21$ nM auf $0,25 \pm 0,02$ nM. Die Gerinnungszeit verlängerte sich um 37,4 %. Dieses Beispiel verdeutlicht das Baukastenprinzip multivalenter Aptamere. Wurden die Eigenschaften des Elementes HD1 verbessert, variierte dies auch die Attribute des Gesamtmoleküls HD1-22.

Die Ergebnisse zur Funktionalität des chemisch modifizierten Aptamers in der biologischen Matrix Plasma verdeutlichten die mögliche Applikation nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der molekularbiologischen Forschung. Letztere benötigt ebenfalls kostengünstige Protein-bindende Moleküle zur Inhibition oder Aktivierung biologischer Prozesse. Dieser Vorgang sollte bestenfalls nicht-invasiv sein, um eine Verfälschung der Beobachtung durch das Messsystem auszuschließen. In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein System zur orts- und zeitaufgelösten Gerinnungsaktivierung etabliert werden. Hierfür wurde HD1, das eine regulatorische Region von Thrombin bindet, mit einer photo-spaltbaren Brücke kovalent mit dem Zielprotein verbunden. Auf diese Weise entstand eine Aptamer-basierte, reversible Epitop-Schutzgruppe. Die katalytische Aktivität des Proteins war inhibiert, ließ sich aber durch Bestrahlung mit UV-Licht wieder reaktivieren.

Alle in dieser Arbeit vorgestellten chemischen Modifikationen von Aptameren verdeutlichen ihr Potential als neue Werkzeuge der Chemischen Biologie für Diagnostik und Forschung.

2. Einleitung

Die Chemische Biologie als Forschungsbereich wird immer wieder vor neue Herausforderungen gestellt. Mit erhöhtem Kostendruck für medizinische Anwendungen werden günstige, verlässliche Systeme notwendig, die eine Information über den Gesundheitszustand des Patienten liefern. Gerade die Analytik von Biomarkern in der klinischen Diagnostik zur Feststellung des Status bzw. des Risikos einer Erkrankung wird den Therapieweg immer stärker beeinflussen.

Durch die fallenden Preise für Genom-Analysen und die Sequenzierung des humanen Genoms^[1] ist es inzwischen möglich, die genetische Disposition für Erkrankungen wie Brustkrebs festzustellen.^[2] Die genetische Untersuchung trifft aber keine Aussage über den tatsächlichen Eintritt der Erkrankung und damit die Expression der Gene, außerdem können durch Spleißen und post-translationalen Modifikationen unterschiedliche Proteine aus demselben Gen hervorgehen.^[3] Daher muss sich die klinische Diagnostik zur Informationsgewinnung über den Status einer Erkrankung mit der Überwachung von Proteinbiomarkern beschäftigen. Deren Detektion in Blut ist eine Herausforderung. Das Zielprotein befindet sich meist in Gegenwart von einer um mehrere Zehnerpotenzen höheren Konzentration von Proteinen wie Albumin.^[4] Außerdem können die Proteinbiomarker bei der Isolierung inaktiviert werden, was die Analytik zusätzlich erschwert.^[5] Gerade in der Diagnostik sind also kostengünstige, robuste Messsysteme notwendig.

Doch nicht nur die klinische Analytik, sondern auch die Erforschung komplexer biologischer Sachverhalte, die neue Einblicke und im günstigsten Fall sogar neue Therapieansätze liefern, erfordert innovative, kostengünstige Werkzeuge. Die Molekularbiologie untersucht Vorgänge innerhalb des lebenden Organismus sowie innerhalb der Zelle möglichst orts- und zeitaufgelöst. Dabei können die Methoden, mit denen die Messungen durchgeführt werden, deren Ergebnisse beeinflussen. Um dies zu verhindern, wird der Einsatz von nicht-invasiven Systemen zur Kontrolle von biologischen Vorgängen immer wichtiger. Gerade die Steuerung von Prozessen durch Licht steht dabei im Fokus vieler Forschungsbemühungen.^[6]

Sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Molekularbiologie dominieren Anwendungen auf der Basis von Antikörpern. Diese besitzen mit 20 unterschiedlichen Aminosäuren in der variablen Domäne eine hohe Diversität. Antikörper müssen allerdings aufwendig vom Immunsystem eines lebendigen Organismus gebildet werden. Sie sind große Moleküle, die ursprünglich nicht für den Einsatz in der Diagnostik oder Forschung bestimmt sind.^[7] Außerdem ist die Herstellung in Tieren kostenintensiv und wirft ethische Fragestellungen auf.^[8]

Aptamere, aus Nukleinsäuren bestehende Bindungsmoleküle, können hingegen zielgerichtet auf ihre spezielle Anwendung hin entwickelt werden.^[9] Diese

Einleitung

Werkzeuge können durch Festphasensynthese im großen Maßstab hergestellt werden und lassen sich einfach chemisch modifizieren, was sie zum kostengünstigen Einsatz in der Diagnostik und Forschung prädestiniert.

2.1. Aptamere

Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die vielfältige molekulare Strukturen erkennen. Neben niedermolekularen organischen Verbindungen werden Epitope auf Proteinen und hochkomplexe Strukturen, wie lebende Zellen, selektiv gebunden. Die Bezeichnung ergibt sich aus dem lateinischen Wort „aptus“ (passend) und dem griechischen Wort „meros“ (Teil).^[10] Aptamere bilden eine definierte dreidimensionale Anordnung ihrer Nukleobasen aus, welche die spezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül ermöglicht.^[9] Die Sequenz der Nukleobasen für ein Aptamer wird in einem kombinatorischen Selektionsprozess ermittelt.^[11] Seit der ersten Beschreibung der Aptamere in den frühen 1990iger Jahren wurde über eine Vielzahl von Anwendungsansätzen in der Analytik sowie in der Entwicklung von Aptamer-basierten Werkzeugen für die Kontrolle von biologischen Prozessen berichtet (siehe Abbildung 1).

Die Analytik einer einzelnen Klasse von Molekülen durch Aptamere wird mit sogenannten Apta-Sensoren durchgeführt (Abbildung 1, Analytik einzelner Molekülgruppen). Die spezifische Bindung der Oligonukleotide an ihre Zielmoleküle erlaubt deren verlässliche Isolation und Quantifizierung. Diesen Effekt nutzend wurde bereits eine Vielzahl an Sensoren auf Basis der Interaktion von Molekülen mit Aptameren, welche in einem messbaren Signal resultiert, entwickelt.^[12] So wurden Immuno-Blot,^[13] Oligonukleotid-Präzipitations-Anwendungen^[14] (in Anlehnung an die Immunopräzipitation), Quarzmikrowaagen,^[15] Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie^[16] und elektrochemische Quantifizierungsmethoden^[17] zur Ermittlung von Analytenkonzentrationen eingesetzt.

Bei diesen diagnostischen Systemen wurde die Konzentration, jedoch nicht die für Enzyme wichtige katalytische Funktionalität der Zielmoleküle, quantifiziert. Prinzipiell können Apta-Sensoren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität eingesetzt werden, da Aptamere in der Regel die natürliche Konformation des Analyten nicht beeinflussen. So wurden bereits einige Apta-Sensoren zur Messung der katalytischen Aktivität von Proteinen entwickelt.^[18] Diese beschäftigten sich allerdings mit der Quantifizierung in artifiziellen Matrizen wie Puffern.^[19]

Die Untersuchung der Proteinaktivität in Proben aus Körperflüssigkeiten wie Plasma hat einige Hürden zu nehmen. Ein Protein mit einer der höchsten Konzentrationen in Plasma ist, mit bis zu 1 mM, Albumin.^[5] Dagegen liegen die Konzentrationen von an der Gerinnungskaskade beteiligten Proteinen wie enzymatisch aktivem Thrombin bei 100 pM^[20] und aktiviertem Protein C (APC) bei 200 pM^[21] im Falle eines Gerinnungsvorgangs, ansonsten sogar weit niedriger. Die Zielproteine müssen also bei einem mindestens 10.000fachen Überschuss an Albumin detektiert werden. Ebenfalls problematisch kann die Inaktivierung der Enzyme während der Aufarbeitung sein. Verschiedene Blutzellen können lysiert werden, was das Testsystem beeinflussen kann.^[4]

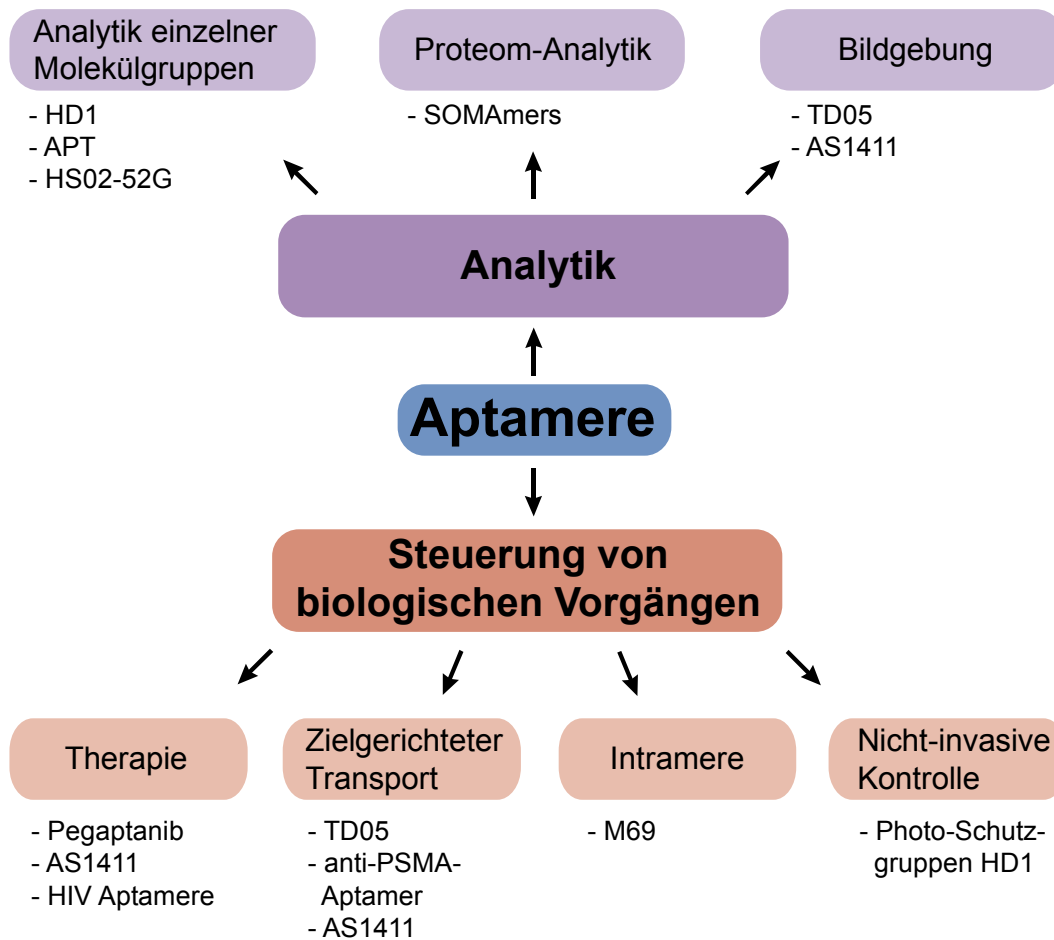


Abbildung 1. Aptamere wurden für verschiedenste Bereiche entwickelt. Übersicht über die Anwendungsgebiete von Aptameren. Die analytischen Applikationen können in die Analytik einzelner Molekülgruppen,^[18] Proteom-Analytik^[5] und Bildgebung^[22] unterteilt werden. Aptamere können aber nicht nur in der Analytik, sondern auch zur Steuerung von biologischen Vorgängen eingesetzt werden. Die Anwendungsgebiete überschneiden sich hier oft, aber es kann zwischen Therapie,^[23] Transportfunktionen, intrazellulären Anwendungen^[24] und nicht-invasiven Kontrollsystemen^[6] unterschieden werden. Für jede Applikation sind Beispiele von Aptameren angegeben, die für die entsprechende Funktion eingesetzt wurden.

Ein Großteil der Aptamere-Sensoren wurde für das Ziel-Enzym Thrombin entwickelt. Da gegen diese Protease ein kurzes und damit leicht zu synthetisierendes DNS-Aptamer (HD1, siehe 2.2 Aptamere und der G-Quadruplex) existiert, ist das sogenannte „Thrombin-Problem“ entstanden.^[25] Viele Forscher haben sich in Ihrer Arbeit auf dieses Oligonukleotid beschränkt, anstatt Ihre Testsysteme auf die Vielzahl an existierenden Aptameren auszuweiten und sie in komplexen biologischen Proben, wie zum Beispiel Plasma, anzuwenden. So wurde bisher kein diagnostisches Testsystem zur Analyse von enzymatisch aktivem Thrombin in Plasma entwickelt.^[20-21]

Neben dieser Problematik existieren nur wenige diagnostische Anwendungen, die sich für den Einsatz in mobilen Testsystemen verwirklichen lassen. Gerade in der klinischen Diagnostik oder in der Untersuchung von Umweltproben ist ein einfach zu bedienendes, mobiles Testsystem von Vorteil. Siebdruck-Elektroden besitzen diese Eigenschaften und werden bereits seit Jahren in der Analytik eingesetzt.^[26] Kombiniert man die Siebdruck-Elektrode mit der Aptamer-Technologie, ergibt sich ein Analysesystem mit hohem Anwendungs-Potential.^[27] Ein Apta-Sensor für Thrombin (mit dem Aptamer HD1) und Lysozym (mit dem Aptamer APT) auf Basis der Siebdruck-Elektroden-Technologie wurde bereits entwickelt, allerdings war dort zusätzlich der Einsatz von magnetischen *beads* nötig.^[28]

Aptamere können nicht nur zur Quantifizierung einer einzelnen Molekülgruppe, sondern auch zur Proteom-Analytik eingesetzt werden (Abbildung 1, Proteom-Analytik). Mit Hilfe der *slow off-rate modified aptamers* (SOMAmers), chemisch modifizierten Aptameren selektiert nach niedrigen Dissoziationsraten, konnte bereits das Proteom im Plasma auf Biomarker für chronisches Nierenversagen^[29] und nicht-kleinzellige Lungenkarzinoma^[30] untersucht werden. SOMAmers öffneten damit die Tür für den Einsatz von Aptameren in Multiplex-Verfahren. Diese Systeme gewinnen für die klinische Diagnostik zunehmend an Bedeutung, da viele Biomarker simultan gemessen werden können, was die Informationsdichte erhöht und gleichzeitig die Kosten senkt.^[4]

Eine selektive Bindung des signalgebenden Moleküls an den Analyten ist in der Fluoreszenzmikroskopie äußerst wichtig, da dadurch störende Hintergrundsignale minimiert werden können.^[31] Aptamere können durch ihre hohe Spezifität diese Herausforderung meistern (Abbildung 1, Bildgebung). Das Aptamer TD05, selektiert gegen B-lymphoblastoide Suspensionszellen aus einem humanem Burkitt-Lymphom (Ramos-Zellen),^[32] konnte mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen werden und ermöglichte damit die fluoreszenzmikroskopische Lokalisation der Zielzellen *in vivo*.^[33] TD05 zeigte allerdings einen drastischen Affinitätsverlust für Bindungsstudien bei 37 °C.^[34] Das DNS-Aptamer AS1411 bindet an Tumorzellen und wird über einen Makropinozytose genannten Prozess in diese aufgenommen.^[35] Es wird nicht nur auf seine Verwendung als eigenständiges Therapeutikum hin untersucht,^[36] sondern kann auch mittels der Modifikation durch fluoreszierende Gruppen zur Markierung von malignen Zellen verwendet werden.^[37] Neben den Zell-bindenden Aptameren TD05 und AS1411 wurde das Oligonukleotid C10 gegen Ramos-Zellen selektiert.^[38] Eine verkürzte Version dieses spezifisch an die B-lymphoblastoiden Zellen bindenden Aptamers, C10.36, wurde, modifiziert mit einer Fluoreszenzmarkierung, mit den Zielzellen inkubiert und mikroskopiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass dieses Aptamer, ähnlich AS1411, von den Zellen aufgenommen wurde.^[39]

Diese analytischen Anwendungen, Apta-Sensoren, Proteom-Analyse und Bildgebung, decken bei weitem nicht das gesamte Spektrum der Einsatzmöglichkeiten von Aptameren ab. In der Diagnostik werden nur die Bindungseigenschaften der Oligonukleotide benötigt. Aptamere besitzen

allerdings nicht nur Affinität zum Bindungsmolekül, sondern beeinflussen durch die Bindung oft auch eine biologische Funktion des Zielmoleküls.

Dies lässt sich besonders in der Therapie nutzen (Abbildung 1, Therapie). So wurde ein Aptamer gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zur Behandlung von feuchter altersabhängiger Makula-Degeneration entwickelt. Dieses Aptamer, Pegaptanib, wurde als Therapeutikum zugelassen und angewandt.^[40] Das Tumorzellen-bindende Aptamer AS1411 befindet sich aktuell in einer klinischen Phase II Studie zur Behandlung von metastasierenden Nierenzellkarzinomen.^[36]

Daneben existieren verschiedene Aptamere gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), zum einen eine RNS gegen die reverse Transkriptase des Virus.^[41] Zum anderen wurde ein RNS-Aptamer selektiert, welches das *Trans-activation response* (TAR)-Element von HIV-1 bindet. Diese Region im HIV-Genom hemmt die Apoptose der Wirtszellen.^[42] Das Aptamer inhibiert die Interaktion des Transkriptions-Transaktivator-Proteins (*transactivator of transcription*, Tat) mit dem TAR-Element und damit die Tat-vermittelte Transkription.^[43] Außerdem wurde die DNS-Sequenz T30177 identifiziert, welche die HIV-1 Integrase bindet und damit den Einbau der Virus-DNS in das Genom der Wirtszelle verhindert.^[44] Diese Oligonukleotide sind zwar nicht als Therapeutika zugelassen, zeugen aber mit ihren Zielmolekülen von der potentiellen Relevanz von Aptameren in der Therapie.

Eine Eigenschaft von Aptameren, die sich unter Umständen in der Therapie anwenden lässt, ist ihre Aufnahme in Zielzellen (Abbildung 1, Zielgerichteter Transport). So können Aptamere, die Oberflächenproteine von Zellen binden, als Transport-Vehikel für andere Moleküle dienen. Das anti-prostataspezifische-Membranantigen (PSMA)-Aptamer, ein Oligonukleotid, welches an das Membran-gebundene Glykoprotein PSMA auf Prostata- und Prostatakarzinomzellen bindet, konnte zum Transport von *small interfering* Ribonukleinsäuren (siRNS),^[45] Toxinen^[46] oder Nanopartikeln^[47] in diese Zellen verwendet werden.

Das Tumorzellen-bindende Aptamer AS1411 wurde zur Bildgebung von Tumorzellen eingesetzt^[37] (Abbildung 1, Bildgebung) und ist ein potentielles Therapeutikum bei metastasierenden Nierenzellkarzinomen^[36] (Abbildung 1 Therapie). Daneben konnte es ebenfalls zum Transport von chemisch modifizierten RNS-Fragmenten in die Tumorzellen verwendet werden. Diese RNS-Fragmente inaktivieren natürlich vorkommende, kurze nicht-kodierende RNS, welche wiederum die Transkription der mRNA verhindern (micro RNS, miR).^[48] In einer anderen Studie konnte durch Interkalation in die G-Quadruplex-Struktur (siehe 2.2. Aptamere und der G-Quadruplex) von AS1411 ein photo-Sensibilisator in Tumorzellen eingebracht werden.^[49] In einem ähnlichen Ansatz konnte TD05 zum Transport eines solchen photo-Sensibilisators in Ramos-Zellen eingesetzt werden. Hierfür wurde eine G-Quadruplex bildende Sequenz an das Aptamer fusioniert, welche die Möglichkeit

zur Interkalation bot. Das Fusionsmolekül aus TD05 und G-Quadruplex mit interkaliertem photo-Sensibilisator wurde in die Zellen aufgenommen.^[50]

In den bis hierhin beschriebenen Anwendungen erkennen Aptamere extrazelluläre Ziele wie Proteine im Plasma oder Moleküle der Zelloberfläche. Die meisten molekularbiologischen Prozesse finden jedoch innerhalb der Zelle statt, weshalb den Transportfunktionen der Aptameren eine wichtige Rolle zukommt. Soll aber mit einem Aptamer ein Zielmolekül direkt in der Zelle adressiert werden, können sogenannte Intramere (INTRAZelluläre AptAMERE) eingesetzt werden (Abbildung 1, Intramere).^[51] Beispiele für den Ansatz der Entwicklung solcher Moleküle sind das RNS-Aptamer M69. Das Aptamer inhibiert in einem extrazellulären Testsystem Vertreter der Cytohesin-Familie.^[52] Diese intrazellulären Proteine interagieren nicht nur mit dem Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor (ARF),^[53] es gibt auch Hinweise auf die Mitwirkung an der Signalweiterleitung des *Epidermal Growth* Faktor (EGF) Rezeptors, welcher unter anderem in Lungentumoren hochreguliert ist.^[54] Damit sind diese Aptamere potentielle intrazelluläre Werkzeuge, zum Beispiel in der Behandlung von Lungenkrebs. M69 wurde bereits dazu eingesetzt, ein kleines Molekül zu identifizieren, das als Inhibitor für die Signalweiterleitung des EGF-Rezeptors dient und damit im Tiermodell Lungenkarzinome verkleinern konnte.^[54]

Für die Untersuchung von Prozessen innerhalb eines Organismus oder innerhalb einer Zelle ist es wichtig, dass die Messmethode nicht den zu untersuchenden Sachverhalt beeinflusst und damit das Ergebnis verfälscht. Dies kann durch den Einsatz von nicht-invasiven Systemen zur Kontrolle von biologischen Vorgängen verhindert werden (Abbildung 1, Nicht-invasive Kontrolle). Besonders geeignet hierfür ist der Einsatz von elektromagnetischer Strahlung im Frequenzbereich des Lichts, da einzelne Kompartimente einer Zelle oder Teile eines Organismus orts- und zeitaufgelöst bestrahlt werden können. Die Forschungsbereiche der Optogenetik und der photo-labilen Schutzgruppen bzw. der photo-Schalter beschäftigen sich mit dieser Technik.^[6] Verschiedene Aptamere wurden bereits mit photo-labilen Schutzgruppen versehen und konnten damit biologische Prozesse raum-zeitlich kontrollieren, mehr dazu siehe 2.3 Chemische Modifikationen von Aptameren.

2.2. Aptamere und der G-Quadruplex

Die oben genannten Anwendungen werden durch die Bindung der Aptamere an ihre Zielmoleküle ermöglicht, die sich durch die spezifische Strukturbildung der Nukleobasen erklärt. Die Strukturen können aus Helices mit Watson-Crick-Basen-Paarung, Interaktionen aufgrund von Hoogsteen-Basen-Paarung, ungepaarten Regionen und speziellen Anordnungen wie G-Quadruplexen bestehen. Dabei tragen die intramolekularen Wechselwirkungen zur Stabilität der Faltung des Aptamers bei, während bevorzugt in den ungepaarten Bereichen die Nukleobasen mit aromatischen Strukturen des Zielmoleküls Interaktionen eingehen.^[55]

Die außergewöhnliche Struktur des G-Quadruplexes ist eine planare Anordnung von Guaninbausteinen, die durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ermöglicht wird. Diese Hoogsteen-Basen-Paarung wird durch ein monovalentes Kation, Natrium oder Kalium, stabilisiert (Abbildung 2 a).^[56] Ein G-Quadruplex kann aus einer oder mehreren Guanin(G)-Tetraden bestehen. Die Stapelung von zwei oder mehr G-Tetraden ergibt zusätzliche stabilisierende Effekte durch π - π -Wechselwirkungen der Nukleobasen. Sind alle Teilstränge in 5'-3'-Richtung angeordnet, spricht man von einem parallelen, ansonsten von einem antiparallelen, G-Quadruplex.^[57]

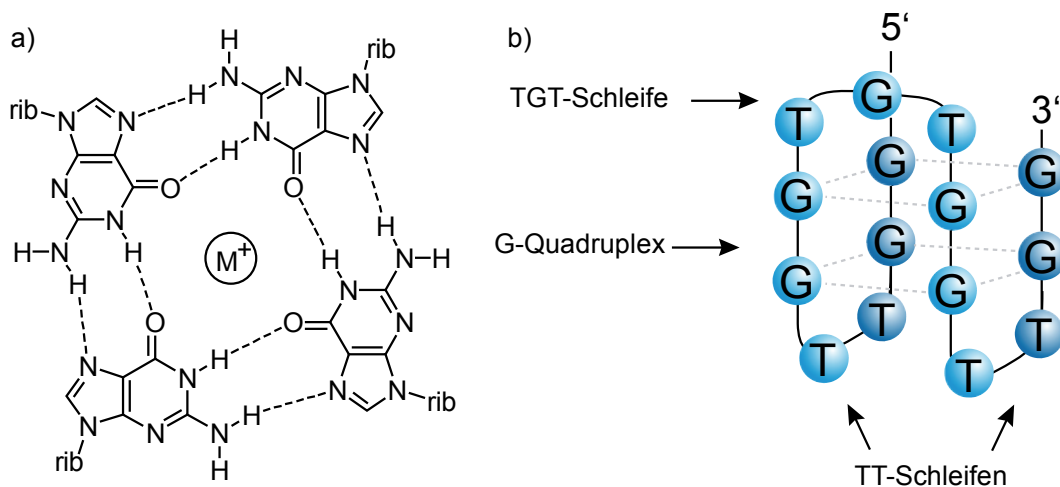


Abbildung 2. Ein G-Quadruplex besteht aus einer oder mehreren Guanin(G)-Tetraden. Das Aptamer HD1 besitzt einen aus 2 G-Tetraden bestehenden antiparallelen G-Quadruplex. a) Wasserstoffbrücken in einer G-Tetrade. Diese Hoogsteen-Basen-Paarung gibt den G-Tetraden die planare Anordnung, die durch ein monovalentes Kation (M^+) verstärkt wird. Bilden sich zwei oder mehr G-Tetraden übereinander aus (Stapelung), ergibt sich ein stabilisierender Effekt durch π - π -Wechselwirkungen. b) Das DNS-Aptamer HD1 besteht aus einem antiparallelen, zweilagigen (2 gestapelte G-Tetraden) G-Quadruplex, einer TGT- und zwei TT-Schleifen.

Es gibt viele Beispiele für G-Quadruplex-Strukturen in Aptameren.^[58] So bildet das DNS-Aptamer T30177, selektiert gegen die HIV-1 Integrase, einen zweilagigen antiparallelen G-Quadruplex aus.^[44, 59] Ein weiteres prominentes Beispiel für ein Oligonukleotid mit einem antiparallelen G-Quadruplex ist das anti-Thrombin DNS-Aptamer HD1 (Abbildung 2 b). Es besteht aus einem G-Quadruplex mit 2 G-Tetraden und zwei TT- sowie einer TGT-Schleife. Durch das Aptamer wird hauptsächlich die Exosite I von Thrombin erkannt.^[60]

Ein weiteres wichtiges Aptamer, das in die Funktionen von Thrombin eingreift, ist das DNS-Aptamer HD22. Es adressiert spezifisch die Exosite II von Thrombin. In seiner Struktur besitzt es am 3'- und 5'-Ende eine komplementäre Sequenz, die eine Stammschleife ausbildet. Die übrige Sequenz ist reich an Guanin-Resten, die die Ausbildung eines G-Quadruplexes nahelegen. In der Publikation zur Selektion von HD22 von Tasset et al. wurde ein zweilagiger, antiparalleler G-Quadruplex als Struktur vorgeschlagen.^[61] Aktuelle Untersuchungen zur Kristallstruktur haben allerdings ergeben, dass HD22 nur eine G-Tetrade besitzt. Dies wird in diesem Fall als pseudo-G-Quadruplex bezeichnet.^[62]

HD22 besitzt eine deutlich höhere Affinität zu Thrombin als HD1. Aus diesem Grund wurden die beiden Thrombin-bindenden Aptamere zu dem Konstrukt HD1-22 fusioniert. Damit wurde ein Inhibitor zur simultanen Blockade von Exosite I und II mit der hohen Affinität von HD22 generiert.^[63] Folglich wurde ein bivalentes Aptamer geschaffen, das in beiden Aptamer-Domänen eine Struktur mit G-Tetraden besitzt.

Das Tumorzellen-bindende Aptamer AS1411 besteht nur aus G- und T-Nukleobasen. Die Chancen für die Ausbildung eines G-Quadruplexes sind damit für dieses Oligonukleotid recht hoch. Interessanterweise formt AS1411 allerdings keine intramolekularen G-Tetraden, sondern zwei Aptamere lagern sich aneinander. Zwei G-Nukleobasen eines AS1411-Moleküls bilden eine intermolekulare G-Tetrade mit zwei G-Nukleobasen eines anderen AS1411-Moleküls. Insgesamt entstehen aus den zwei AS1411-Aptameren acht G-Tetraden, die sich zu vier zweilagigen G-Quadruplexen anordnen.^[64]

Ein weiteres Aptamer mit einer Guanin-reichen Region, das die Möglichkeit zur Ausbildung eines G-Quadruplexes besitzt, ist das DNS-Aptamer C10. Dieses Aptamer wurde durch eine Selektion gegen B-lymphoblastoide Zellen aus einem humanen Burkitt-Lymphom gewonnen. Es bindet spezifisch an die Oberfläche dieser Zellen.^[38] Diese Beispiele verdeutlichen die Relevanz des G-Quadruplex in Aptamer-Sequenzen und die Bedeutsamkeit von strukturstabilisierenden Elementen in Aptameren.

Der G-Quadruplex ist aber kein notwendiges Strukturmerkmal für eine hochaffine Aptamer-Sequenz. Ein Beispiel für ein DNS-Aptamer ohne G-Quadruplex ist HS02-52G. Dieses Oligonukleotid bindet selektiv die basische Exosite von aktiviertem Protein C (APC), einem Protein, das sowohl in der Gerinnungskaskade, als auch in Entzündungsprozessen eine Rolle spielt. Es inhibiert die antikoagulative Aktivität von APC.^[65]

Die Kapitel 1.1 Aptamere und 1.2 Aptamere und der G-Quadruplex zeigen nur einen Ausschnitt aus der Menge an existierenden Aptameren, deren zugehörigen Zielmolekülen und den daraus folgenden Funktionen. Es wird allerdings deutlich, dass die Entwicklung der Aptamere das Spektrum an Werkzeugen der Molekularbiologie stark erweiterte. Unmodifizierte Aptamere sind jedoch oft in komplexen biologischen Proben den Problematiken der geringen Stabilität, Affinität oder dem Abbau durch Nukleasen ausgesetzt.^[66] Dies erschwert ihren Einsatz in klinisch oder molekularbiologisch relevanten Fragestellungen, die in Matrizen wie Körperflüssigkeiten oder dem Zytosol untersucht werden müssen. Chemische Modifikationen können helfen, Aptamere für diese Aufgabenstellungen anwendbar zu machen.

2.3. Chemische Modifikationen von Aptameren

Das Einsatzspektrum von Aptameren wird durch deren chemische Modifikationen kontinuierlich erweitert. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist der Einsatz von Modifikationen am C5 von Desoxyuridin in den SOMA-mers, die die strukturelle Variabilität der Nucleobasen und damit die Interaktionsmöglichkeiten mit den Zielmolekülen erhöhte.^[5]

Chemische Modifikationen werden mittels Festphasensynthese in die Aptamer-Sequenzen eingebracht. Phosphoramidite, welche die entsprechende Alternation der Nucleobasen tragen, werden an der gewünschten Stelle in den Reaktionszyklus eingebracht.^[67] Dies ermöglicht die punktgenaue, aber technisch simple Modifikation von Aptameren, so dass kostengünstig eine Vielzahl an chemischen Variationen in die Moleküle eingebracht werden können.

Generell kann zwischen einer Basen- und einer Zucker-Phosphatrückgrat-Modifikation unterschieden werden.^[68] Für viele der in 2.1. Aptamere genannten Beispiele waren bereits Veränderungen der chemischen Struktur der Nucleobasen notwendig.

So werden für den Einsatz von Aptameren in der Diagnostik die Oligonucleotide meist mit einem Anker versehen, um die Immobilisierung auf Oberflächen zu ermöglichen.^[69] Diese Befestigung kann über die Ausbildung einer kovalenten Bindung oder die Interaktion starker, nicht kovalenter Wechselwirkungen, wie die zwischen Biotin und Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* (Abbildung 3 b), erfolgen. Für die kovalente Bindung kann unterschiedliche Chemie genutzt werden, wie zum Beispiel die Reaktion von Amino-Gruppen (Abbildung 3 c) am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers mit N-Hydroxysuccinimidester(NHS)-Resten,^[70] welche zusätzlich mit Maleimid funktionalisiert sein können und damit den *cross-link* mit Sulfhydryl-Gruppen auf der Immobilisierungsoberfläche ermöglichen.^[71] Diese Funktionalisierungsmethode kann auch verwendet werden, um Aptamere mit fluoreszierenden Gruppen zu markieren (Abbildung 3 a). Die Fluoreszenzmarkierungen können über dieselben chemischen Reaktionen wie die Immobilisierungs-Anker in die Aptamere eingebracht werden und erlauben damit deren Einsatz in der Bildgebung oder der Durchflusszytometrie.^[33, 38, 72]

Neben diesen Modifikationen im Zucker-Phosphat-Rückgrat am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers spielen chemische Veränderungen der Ribose selbst eine große Rolle in der Strukturstabilisierung sowie beim Schutz vor dem Abbau durch Nucleasen.^[66] Da die Spaltung der Phosphodiester-Bindung durch diese Enzyme bei RNS-Aptameren über die 2'-Hydroxyl-Gruppe der Ribose katalysiert wird, ist besonders dort eine Substitution dieser Gruppe interessant.^[73]

So besitzt das Therapeutikum Pegaptanib, ein RNS-Aptamer, neben einer Polyethylenglycol-Verlängerung am 5'-Ende 2'-desoxy-2'-fluoro-Modifikationen der Pyrimidin- sowie 2'-O-Methyl-Modifikationen der Purinbasen. Zusammen erhöhen diese chemischen Veränderungen die Halbwertszeit des modifizierten Aptamers in humanem Plasma durch einen verringerten Abbau durch Nucleasen und eine reduzierte Ausscheidung über die Niere.^[74]

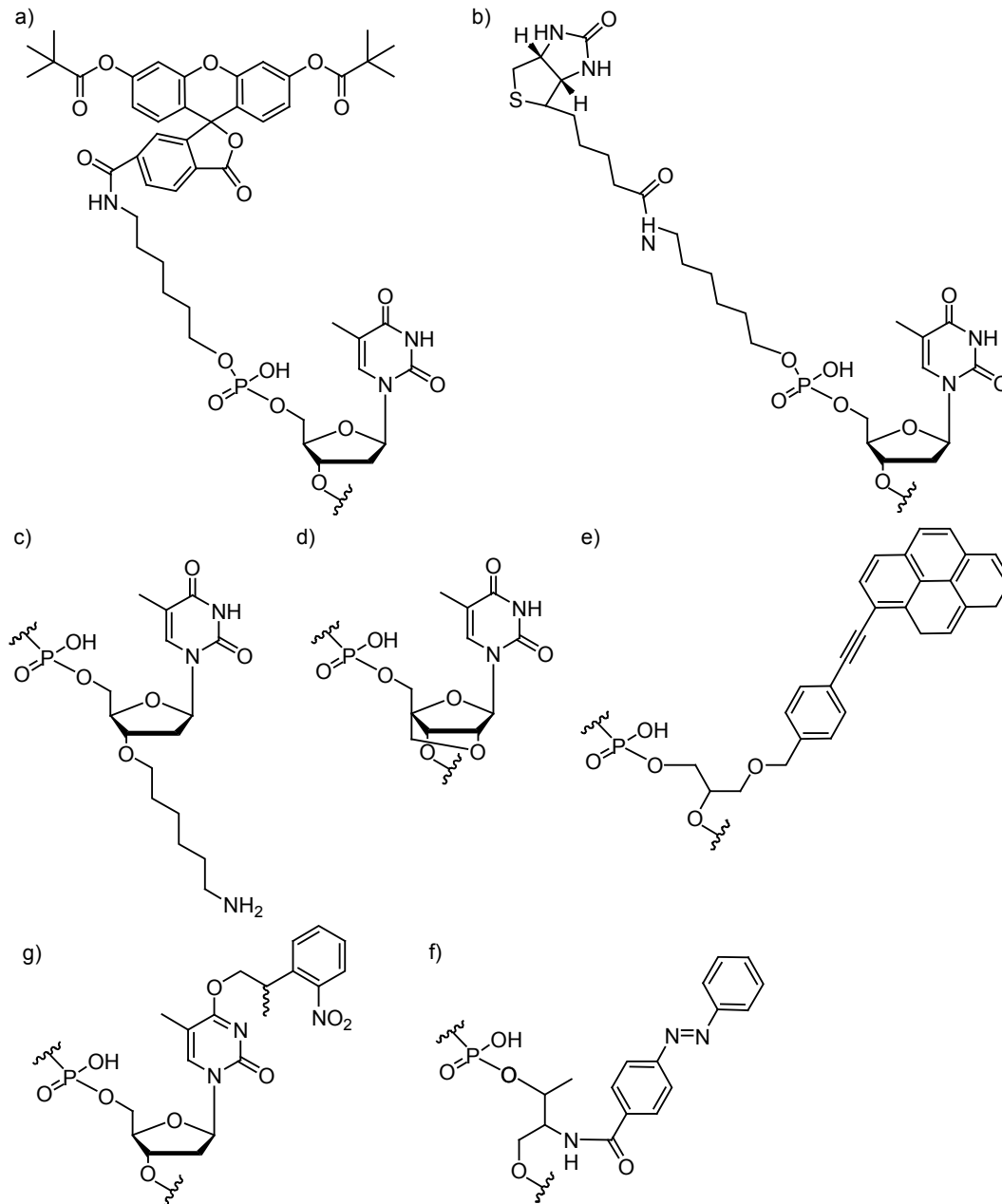


Abbildung 3. Nucleinsäuren können auf verschiedenste Arten chemisch modifiziert werden. Ausgewählte chemische Modifikationen von Nucleinsäuren. Als Nucleobase wurde repräsentativ Thymin gewählt. a) 5'-Fluoreszenzmarkierung mit 6-Carboxy-fluorescein b) 5'-Biotin-Modifikation. c) 3'-Amino-Modifikation. d) 1-LNS-Modifikation. e) para-TINA-Modifikation. f) Azobenzol-Modifikation. g) o-Nitrophenyl-propyl-cage-Modifikation.

Wird eine zusätzliche Methylen-Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff eingebaut, verbessert dies nicht nur den Schutz vor Nucleasen, sondern schränkt auch die Beweglichkeit des Zucker-Phosphat-Rückgrats ein. Die Nucleobase ist in ihrer Ausrichtung fixiert (*to lock* englisch feststellen, Abbildung 3 d).^[75] Diese *Locked-Nucleinsäuren* (LNS) zeigten erhöhte thermische Stabilität. Außerdem wurde durch den Austausch einer Base mit LNS

für ein Avidin-bindendes Aptamer die Affinität um den Faktor 8,5 erhöht.^[76] Die Modifikation des Ramos-Zellen bindenden Aptamers TD05 mit LNS innerhalb des Doppelstrangs in seiner Stammschleifenstruktur führte zu einer erhöhten Nuklease-Resistenz und einer verlängerten Plasma-Halbwertszeit.^[77] Daneben konnte in der Fluoreszenzmikroskopie durch den Einbau der LNS in TD05 die Detektionszeit verlängert und damit das Detektionslimit gesenkt werden.^[78] Für das Aptamer, welches das TAR-Element von HIV-1 erkennt, konnte mit LNS die Interaktion des Aptamers mit der Zielsequenz stabilisiert werden. Durch diese Modifikation wurde die Selektivität des Aptamers erhöht.^[79] Diese verstärkten Hybridisierungseigenschaften konnten unter anderem in einem Ansatz genutzt werden, bei dem mit LNS modifizierte RNS-Fragmente miR-Moleküle in Tumorzellen inaktivierten. Diese LNS-modifizierten RNS-Fragmente wurden mittels Fusion mit dem AS1411-Aptamer in die Zellen eingebracht und reduzierten deren metabolische Aktivität.^[48]

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung der Struktur von Oligonukleotiden sind verdrehte interkalierende Nukleinsäuren (*Twisted intercalating nucleic acids*, TINAs, Abbildung 3 e). Sie werden zur Stabilisierung von Duplexen und zur Ausbildung von Triplexen eingesetzt und erhöhen ebenfalls die thermische Stabilität von Oligonukleotid-Strukturen.^[80] Sie ersetzen komplette Nukleoside oder können zusätzlich zu der bestehenden Sequenz eingebaut werden. Damit bestehen die TINA-Modifikationen aus Basen- und Zucker-Modifikationen. Sie wurden bereits erfolgreich in das einen antiparallelen G-Quadruplex besitzenden anti-HIV-1-Integrase Aptamer T30177 eingebaut. Dort steigerten sie die metabolische Aktivität von HIV-infizierten Zellen.^[81]

Reine Basenmodifikationen hingegen sind photo-labile Schutzgruppen, sogenannte „cages“ (Abbildung 3 f). In den letzten Jahren wurden diese Abschirmungen von chemischen Gruppen oft, nicht nur in Nukleotiden, zur externen Kontrolle biologischer Phänomene mit einer möglichst hohen Zeit- und Ortsauflösung verwendet. Die Strategie der lichtsensiblen Schutzgruppen ermöglicht die Freigabe von Molekülen zum gewünschten Zeitpunkt am gewünschten Ort.^[6, 82] Die chemische Modifikation der Nukleobasen durch o-Nitrophenyl-propyl-cages dient entweder dem Ziel, Basen-Paarungen zu unterbinden oder die Interaktion von Basen mit dem Zielmolekül zu verhindern. Diese spezielle photo-labile Schutzgruppe wurde unter anderem bereits in den Anti-Thrombin-Aptameren HD1,^[83] HD22^[84] und HD1-22^[85] sowie für das Cytohesin-bindende Aptamer C10.41^[86] angewandt. Durch die Einführung der photo-labilen Schutzgruppe in die Oligonukleotid-Struktur konnte die inhibitorische Aktivität des Aptamers durch Licht aktiviert werden. Um ein durch Bestrahlung inaktivierbares Oligonukleotid zu erschaffen, wurden die Thrombin-Aptamere mit einer Antisense-Sequenz versehen, die wiederum eine oder mehrere photo-labile Schutzgruppen an den Nukleobasen trug (Abbildung 4 a). Wurden nun die Schutzgruppen mittels Licht entfernt (*uncaging*), bildete sich ein Doppelstrang aus, der zu einer Entfaltung des G-Quadruplexes führte und das Aptamer inaktivierte (Abbildung 4 b).^[87]

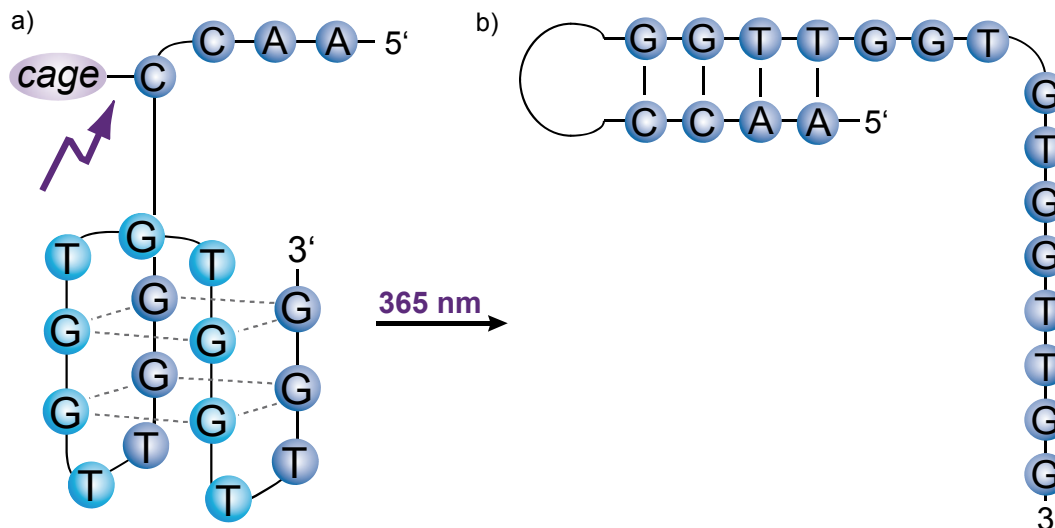


Abbildung 4. HD1 mit einer Antisense-Verlängerung, die eine cage-Schutzgruppe trug, konnte durch UV-Bestrahlung inaktiviert werden. Hier ist die lichtabhängige Deaktivierung des Thrombin-Aptamers HD1 dargestellt. Das Oligonukleotid wurde mit einer Antisense-Region verlängert, die eine photo-labile Schutzgruppe trug (a). Durch diese chemische Modifikation war die Antisense-Sequenz nicht in der Lage, einen Duplex mit dem Aptamer auszubilden. Wurde durch UV-Bestrahlung die photo-labile Schutzgruppe abgespalten, fand Basen-Paarung zwischen dem Antisense-Strang und dem komplementären Aptamer-Part statt (b). Damit wurde die für die Bindung nötige Struktur des Aptamers zerstört, es zeigte keine Aktivität.

Cages sind photo-labile Schutzgruppen. Wenn sie einmal von dem Zielmolekül abgespalten wurden, ist die Reaktion unumkehrbar. Um eine Wellenlängen-abhängige, reversible Schaltung zu erreichen, können Azobenzol oder Spiropyrane eingesetzt werden. Die planare *trans*-Anordnung des Azobenzols (Abbildung 3 g) kann durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 365 \text{ nm}$) in die *cis*-Form gebracht werden, in der beide Hälften des Moleküls um 55° zueinander gekippt sind. Licht bei 450 nm oder thermische Energie können *cis*-Azobenzol wieder in die *trans*-Form überführen.^[88] In Nukleinsäuren wurde Azobenzol bereits als Basenmodifikation^[89] oder Basenersatz,^[90] ähnlich den TINA-Modifikationen, eingesetzt. Im Bereich der Aptamere wurde das System der photo-steuerbaren Antisense-Sequenz des HD1-Aptamers nicht nur mit einer *cage*- sondern auch mit einer Azobenzol-Gruppe angewandt. Die photo-sensible Modifikation ist in ihrer planaren *trans*-Struktur in der Lage, in einem DNS-Duplex zu interkalieren. In der *cis*-Struktur hingegen stört Azobenzol die Doppelstrangausbildung. Der Antisense-Strang bindet nicht und HD1 kann den zur Thrombin-Bindung nötigen G-Quadruplex ausbilden.^[91] Da dies bisher allerdings eines der wenigen Beispiele für den Einsatz von Azobenzol in Aptamern ist, wird das vorhandene Potential der Lichtkontrolle von Aptamern nicht nur durch photo-labile Schutzgruppen, sondern auch durch photo-Schalter deutlich.

Das bereits vorhandene breite Anwendungsspektrum von chemisch modifizierten Aptameren wurde durch die hier vorgestellten Beispiele anschaulich. Trotzdem basieren fast alle Testsysteme der klinischen Routine-Diagnostik weiterhin auf Antikörpern. Das Therapeutikum Pegaptanib wurde bereits wieder vom Markt genommen. Es sind also weitere Anstrengungen nötig, die den Nutzen von chemisch modifizierten Aptameren verdeutlichen und zeigen, dass Aptamere nicht nur in artifiziellen Systemen, sondern auch in der klinischen Diagnostik und in der molekularbiologischen Forschung durchaus Anwendungspotential haben.

2.4. Blutgerinnung

Diese Arbeit beschäftigt sich, neben anderen Problemstellungen, mit der chemischen Modifikation von Aptameren, die in die Blutgerinnungskaskade eingreifen. Daher wird im Folgenden dieser Prozess zusammengefasst dargestellt und das für diese Arbeit zentrale Protein, Thrombin, wird besonders herausgestellt.

2.4.1. Die Gerinnungskaskade

Die Blutgerinnungskaskade, auch Hämostase genannt, beschreibt die Interaktionen von Proteinen, die an der Ausbildung eines Blutgerinnsels beteiligt sind. Es handelt sich hierbei um einen komplexen, hoch regulierten Prozess, der im Falle einer Blutung schnell, aber nur am Ort der Verletzung, die Gerinnselbildung forcieren muss.

Aktiviert wird die Hämostase durch die Verletzung des Endothels eines Blutgefäßes über den sogenannten extrinsischen Weg (Abbildung 5). Die Beschädigung von Endothelzellen bewirkt einen direkten Kontakt des subendothelialen *tissue factor* (TF) mit dem Blutstrom. Dieses Protein bindet den in geringen Mengen im Blut zirkulierenden aktivierten Faktor VII (FVIIa). Der Komplex aus TF und FVIIa aktiviert weiteren FVII, um die Koagulationsinitiation zu beschleunigen. Außerdem werden die Faktoren IX (FIX) und X (FX) durch die Verbindung von TF und FVIIa aktiviert. Hierbei ist der aktivierte FX (FXa) in der Lage, eine geringe Menge an Prothrombin (FII) in enzymatisch aktives Thrombin (FIIa) zu überführen, welches wiederum die Kofaktoren V (FV) und VIII (FVIII) zu aktivieren vermag. FIXa bildet nun zusammen mit dem aktivierten Faktor VIII (FVIIIa) den sogenannten Tenasekomplex, der effizient weiteren FXa entstehen lässt (Initiationsphase).^[92] Thrombozyten, die initial über den von Willebrand-Faktor (vWF) an das beschädigte Gewebe gebunden haben, dienen nicht nur als Phospholipid-reiche Oberfläche, auf der die hier geschilderten enzymatischen Vorgänge ablaufen, sondern schütten auch bereits aktivierten Faktor V (FVa) aus, so dass dessen lokale Konzentration weiter erhöht wird. FVa und FXa bilden den sogenannten Prothrombinase-Komplex, der nun weitaus effektiver Prothrombin (FII) in enzymatisch aktives Thrombin (FIIa) überführt (Amplifikations- und Propagationsphase).^[93] Das gebildete Thrombin kann nun den zentralen Schritt der Koagulation katalysieren, die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Aus den Fibrin-Monomeren entstehen Fibrin-Multimere, die letztlich einen quervernetzten Fibrin-Thrombus ausbilden. Zusammen mit den gebundenen Thrombozyten verschließt der Fibrin-Thrombus das beschädigte Blutgefäß.^[94]

Thrombin besitzt neben der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und der Fibrinogen-Spaltung weitere Funktionen. So aktiviert es Thrombozyten durch die Abspaltung des extrazellulären N-Terminus des Protease-aktivierten Rezeptors (PAR-1). Die Blutplättchen exprimieren daraufhin Glykoprotein Ib (GPIb). Dieses Oberflächenprotein kann mit dem an die Stelle der Gefäßverletzung gebundenen

vWF interagieren und trägt somit zur Aggregatbildung der Thrombozyten bei.^[95] Außerdem initiiert Thrombin die Reduktion seiner eigenen Bildung, da es an der Aktivierung von Protein C (siehe 1.4.2 Inhibitoren des Gerinnungssystems) beteiligt ist.^[96]

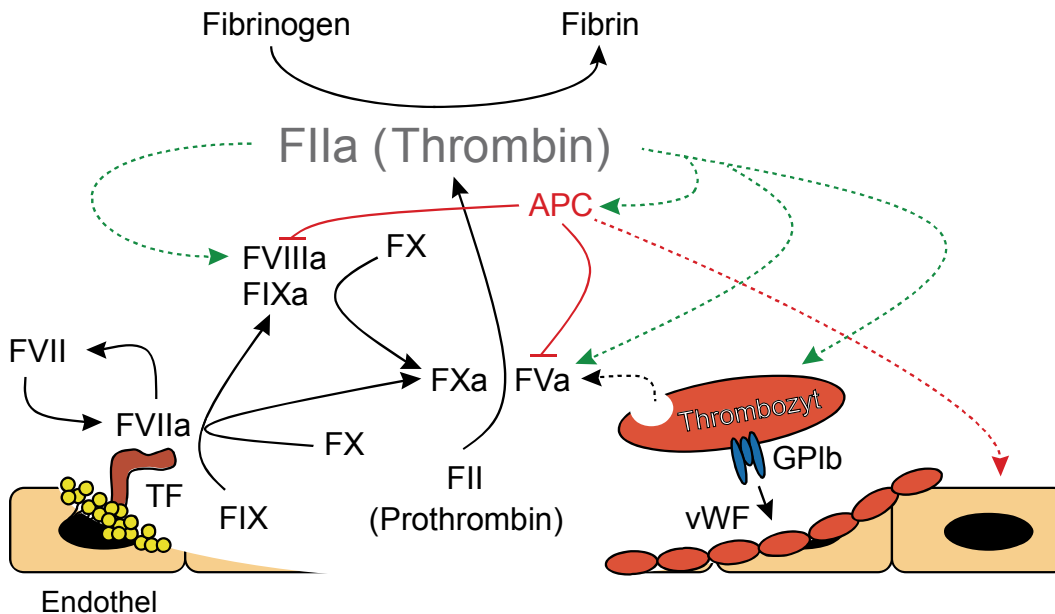


Abbildung 5. Thrombin ist das zentrale Protein der Hämostase. Der extrinsische Weg der Blutgerinnungskaskade. Eine Beschädigung des Endothels eines Blutgefäßes setzt den *tissue factor* (TF) in Kontakt mit dem Blutstrom. TF bindet und aktiviert den Koagulationsfaktor VII (FVII). Der Komplex aus TF und FVIIa aktiviert die Koagulationsfaktoren IX und X (FIX, FX). FXa kann geringe Mengen von Prothrombin (FII) in Thrombin (FIIa) überführen, welches die Koagulationsfaktoren V (FV) und VIII (FVIII) aktiviert. FIXa bildet zusammen mit FVIIIa einen Komplex, der zusätzlichen Koagulationsfaktor X (FX) aktiviert. FXa assoziiert sich mit FVa zu dem Prothrombinase-Komplex und schneidet größere Mengen an Prothrombin zu Thrombin. Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin und ermöglicht damit die Bildung des Fibrin-Gerinnels. Es aktiviert zusätzlich die Thrombozyten, die daraufhin Glykoprotein Ib (GPIb) exprimieren. GPIb bildet einen Komplex mit von Willebrand Faktor (vWF) auf der Oberfläche des Endothels, was in der Aggregation der Thrombozyten resultiert. Zusätzlich setzt Thrombin seine eigene Inaktivierung durch aktiviertes Protein C (APC) in Gang. Abbildung nach^[97], modifiziert.

Die Hämostase kann auch durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen, wie zum Beispiel Kollagen, aktivierten Thrombozyten, oder auch Glas, in diesem Fall außerhalb des Organismus, gestartet werden. Dieser Vorgang wird als Kontaktaktivierung bezeichnet. Bei diesem intrinsischen Weg wird Faktor XII, auch Hagemann-Faktor genannt, aktiviert, der wiederum Faktor XI aktiviert. Faktor XIa aktiviert Faktor IX, der dann den schon benannten Tenasekomplex mit aktiviertem Faktor VIII eingeht. Ab diesem Punkt sind intrinsischer und extrinsischer Weg identisch, letztendlich wird Prothrombin zu Thrombin gespalten und führt zur Gerinnelbildung.^[98]

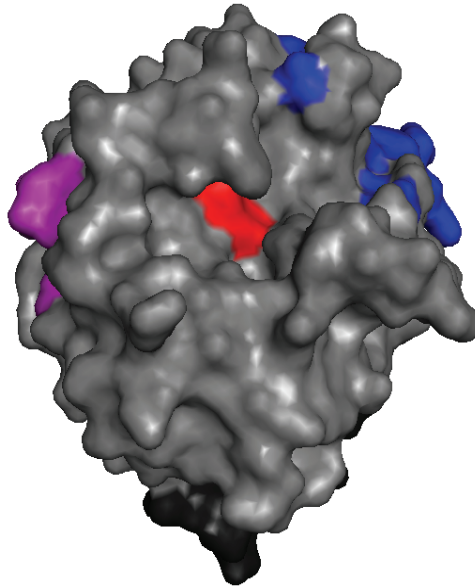


Abbildung 6. Die Protease Thrombin besitzt ein aktives Zentrum und zwei Exosites. Kristallstruktur von Thrombin. Das aktive Zentrum ist rot markiert, Exosite I blau und Exosite II violett. Die schwere Kette ist in hellgrau, die leichte Kette in dunkelgrau dargestellt. PDB-Datei: 1PPB.

Das zentrale Protein der Hämostase ist somit Thrombin, das neben einer Reihe von anderen Funktionen die essentielle Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Diese unterschiedlichen, zum Teil gegenläufigen Effekte werden über verschiedene Epitope, die sogenannten Exosites, dirigiert. Hierbei ist Exosite I (Abbildung 6, blau) die Bindestelle für Fibrinogen, für die Spaltung zu Fibrin durch das aktive Zentrum (Abbildung 6, rot) muss Fibrinogen zunächst diese Exosite erkennen.^[99] Exosite II (Abbildung 6, violett) hingegen ist die Bindungsstelle für Glykosaminoglykane wie Heparin. Dieses Polysaccharid verstärkt die Bindung von Serpinen wie Antithrombin III oder Heparin Cofaktor II und mediiert damit die Inaktivierung von Thrombin (siehe 1.4.2 Inhibitoren des Gerinnungssystems).^[100] Thrombin besteht aus einer schweren (Abbildung 6, hellgrau) und einer leichten Kette (Abbildung 6, dunkelgrau), die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. Beide Exosites sowie das aktive Zentrum befinden sich auf der schweren Kette.^[101]

2.4.2. Inhibitoren des Gerinnungssystems

Die Hämostase muss schnell am Endothel eines beschädigten Blutgefäßes einsetzen. Sie darf allerdings auch nur dort stattfinden und muss auf den Bereich der Verletzung begrenzt bleiben. Andernfalls droht die Bildung von Blutgerinnseln, die zu Ischämien und damit zu Thrombosen, Embolien und Herzinfarkten führen können. Der Organismus beugt diesen Vorgängen mit physiologischen Inhibitoren der Gerinnungsproteine vor.^[102]

Einer dieser physiologischen Inhibitoren des Gerinnungsprozesses ist die Vitamin-K- abhängige Serin-Protease Protein C. Aktiviertes Protein C (APC) spaltet zum einen FVa und FVIIIa und verhindert somit unter anderem die Ausbildung des Komplexes von FVa mit FXa, der für die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin maßgeblich ist (Abbildung 5).^[103] Zum anderen interagiert es, zusammen mit dem *Endothelial protein C receptor*, mit dem Protease-aktivierten Rezeptor (PAR-1) auf Endothel-Zellen. Dies hat einen anti-inflammatorischen Effekt zur Folge.^[104] APC besitzt, ähnlich wie Thrombin, zwei Exosites. Die basische Exosite ist in die Spaltung von FVa und FVIIIa involviert,^[96] während die saure Exosite an der Interaktion von APC mit PAR-1 beteiligt ist.^[105]

Thrombin ist essentiell zur Ausbildung des Blutgerinnsels am Ort des beschädigten Blutgefäßes. Außerhalb des Bereiches der Verletzung muss es aber schnell inaktiviert werden. Dafür ist nicht nur der indirekte Weg über APC, sondern auch die direkte Inhibition durch Serpine wie Antithrombin III und Heparin Cofaktor II möglich. Freies Thrombin in der Blutbahn wird an seiner Exosite II durch Heparin erkannt. Dies verstärkt die Bindung von Antithrombin III oder Heparin Cofaktor II zu Thrombin, die dessen aktives Zentrum blockieren und damit die enzymatische Aktivität ausschalten. Dies erklärt den Einsatz von Heparinen als gerinnungshemmendes Medikament.^[100]

Als direkter Inhibitor von Thrombin wirkt das nicht-physiologische Molekül Hirudin. Dieses Peptid aus dem Speichel von *Hirudo medicinalis* erkennt simultan die Exosite I und das aktive Zentrum von Thrombin mit einer sehr hohen Affinität (K_d -Wert von 0,2 pM) und verhindert damit dessen amidolytische Aktivität.^[106] Das ebenfalls nicht-physiologische Molekül Argatroban bindet und blockiert hingegen nur das katalytische Zentrum und besitzt eine Dissoziationskonstante von 40 nM.^[107] Der Serin-Proteasen-Inhibitor Aprotinin ist ein Peptid, welches das katalytische Zentrum Trypsin-ähnlicher Enzyme blockiert. Da APC zur Klasse der Serin-Proteasen gehört, lässt sich Aprotinin zu dessen Inhibition einsetzen.^[108]

Dies sind nur einige aus der Vielzahl an Inhibitoren der Hämostase. Das generelle Problem bei therapeutischen Eingriffen in das Gerinnungssystem bleibt, trotz der vielfältigen Inhibitoren, bestehen. Eine zu intensive Gerinnungsinhibition kann zu schweren Blutungen führen, eine zu geringe Inhibition oder gar eine Koagulationsaktivierung wiederum zu Ischämien. Die orts- und zeitaufgelöste Kontrolle der Gerinnung ist und bleibt damit eine Herausforderung der modernen Medizin.

3. Ziel der Arbeit

Aptamere haben sich zu einer günstigen und verlässlichen Alternative zu den hauptsächlich von Antikörpern dominierten Anwendungen in der Diagnostik sowie in der Kontrolle von biologischen Prozessen entwickelt. Trotzdem konnten sie sich im routinemäßigen Einsatz noch nicht durchsetzen.

Mit dieser Arbeit soll die klinische Diagnostik um kostengünstige, verlässliche Techniken erweitert werden. Sie soll zur Entwicklung von Messmethoden mit niedrigem Detektionslimit für die Quantifizierung von Enzymen und deren katalytischer Aktivität unter Verwendung von Aptameren beitragen.

Ausreichende thermische Stabilität und inhibitorische Aktivität sind Herausforderungen, die Aptamere für ihre Verwendung bewältigen müssen. Viele Aptamere durchbrechen die Schwelle der *in vitro*-Anwendung zur Applikation *in vivo* nicht, da ihre Stabilität oder Affinität zu ihrem Zielmolekül in komplexen biologischen Matrizen zu gering ist.^[25] In dieser Arbeit sollen die Modifikationen TINA und LNS die Struktur in Oligonukleotiden stabilisieren und die Bindung zum Zielmolekül erhöhen. Außerdem soll das Verständnis für die Beziehung von Aptamer-Sequenz und Position der Modifikation verbessert werden.

Gerade bei dem Eingriff in Gerinnungsprozesse ist eine exakte Orts- und Zeitauflösung nötig, da sonst lebensbedrohliche Ischämien drohen. Das Thrombin-Aptamer HD1 mit photo-labiler Schutzgruppe kann im Plasma entschützt werden, hat aber nur eine Halbwertszeit von 1,5 Minuten im Blut.^[109] Wenn mit dem deaktivierbaren HD1 (Abbildung 4) lichtabhängige Epitop-Freigabe realisiert werden sollte, müsste zunächst sichergestellt werden, dass das Aptamer das Epitop überhaupt erreicht. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Werkzeugkiste der Chemischen Biologie um das Werkzeug der lichtgesteuerten Entschützung von Epitopen auf Proteinen durch Aptamere zu erweitern.

4. Ergebnisse

4.1. Lysozym-Apta-Sensor

Apta-Sensoren sind hilfreiche Werkzeuge zur Quantifizierung von Molekülen wie Hormonen und enzymatisch aktiven Proteinen.^[18] Um die Oligonukleotide in der Diagnostik anwenden zu können, muss in den meisten Fällen der Aptamer-Teil auf einer Sensoroberfläche immobilisiert werden. Dafür ist eine chemische Modifikation wie zum Beispiel eine Amino-Gruppe am 3'- oder 5'-Ende des Aptamers nötig.^[69] Die hier beschriebenen Experimente waren Teil eines Projekts, in dem ein Amino-modifiziertes DNS-Aptamer benutzt wurde, das immobilisiert auf Carbonsäure-modifizierten mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren in einem elektrochemischen Sensor, an Lysozym bindet.

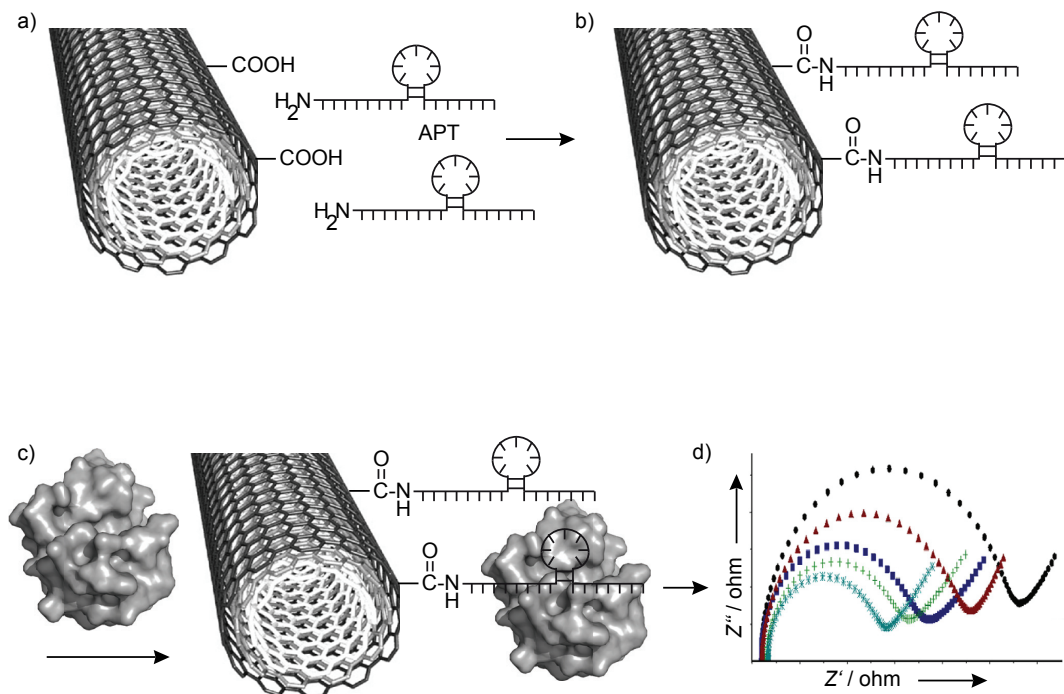


Abbildung 7. Lysozym-Apta-Sensor mit Amino-modifiziertem Lysozym-Aptamer (APT) auf Carbonsäure-modifizierten mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren zur Quantifizierung von Lysozym. a) Carbonsäure-modifizierte mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren auf einer Siebdruck-Elektrode reagierten mit dem Amino-modifiziertem Lysozym-Aptamer APT und wurden b) mittels einer Amidbindung auf den mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren immobilisiert. c) Bei Zugabe von Lysozym wurde dieses vom Aptamer erkannt und band an die APT-modifizierte Oberfläche. d) Diese Bindung konnte mittels Impedanz-Messung der Elektrode quantifiziert werden. PDB-Datei: 2LYZ.

Damit wurde die Ermittlung der Konzentration des Zielproteins über Impedanz-Messungen ermöglicht. Die Impedanz, auch Wechselstromwiderstand genannt, gibt das Verhältnis von elektrischer Spannung an der Messelektrode zu aufgenommenem Strom an.^[110]

Die mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren dienen zur Oberflächenvergrößerung der eingesetzten Siebdruck-Elektrode, welche die direkte Messung des unmodifizierten Analyten ermöglicht. Ziel dieser Studie war, die Vorteile von Impedanz-basierten Methoden zur Proteinquantifizierung, welche Aptamere, immobilisiert auf Kohlenstoffnanoröhren, verwenden, zu verdeutlichen. Die Funktionalisierung der Kohlenstoffnanoröhren und die Impedanz-Messungen wurden durch unsere Kooperationspartner um Arzum Erdem von der Abteilung Analytische Chemie der Pharmazeutischen Fakultät der Ege University Izmir, Türkei, durchgeführt.^[111]

Zur Herstellung des Apta-Sensors wurden zunächst das 5'-Amino-modifizierte Lysozym-Aptamer (APT) und eine 5'-Amino-modifizierte randomisierte Kontroll-DNS auf jeweils eine Siebdruck-Elektrode mit einer Oberfläche aus mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren mit Carbonsäure-Modifikation gegeben (Abbildung 7 a). Die Carbonsäure auf den Kohlenstoffnanoröhren kondensierte unter Ausbildung einer Amidbindung mit der Aminogruppe des Aptamers, das dadurch kovalent mit der Oberfläche der Elektrode verknüpft war (Abbildung 7 b). Wurde nun eine Lysozym-Lösung auf die Elektrode gegeben, band das Aptamer an Lysozym und hielt letzteres auf der Elektrode fest (Abbildung 7 c), was zu einer Änderung des Impedanz-Signals führte (Abbildung 7 d). Mit Hilfe einer Standard-Kurve konnte dieser Apta-Sensor die Lysozym-Konzentration der Lösung determinieren.

4.1.1. Bindung von Amino-modifiziertem Lysozym-Aptamer

Die oben beschriebene Funktionsweise des Apta-Sensors setzte voraus, dass das Aptamer auch mit der Amino-Modifikation das Zielprotein Lysozym erkennt und auf der Elektrode festhält. In einer vorangegangenen Studie wurde bereits demonstriert, dass dieses Aptamer mit einer 5'-Biotin-Modifikation in einem Apta-Sensor einsetzbar war.^[28] Trotzdem könnten sich durch den Austausch der 5'-terminalen Gruppe von Biotin- zu Amino-Modifikation die Bindungseigenschaften geändert haben. Daher wurde die Affinität des 5-Amino-funktionalisierten Lysozym-Aptamers (APT) und einer 5'-Amino-funktionalisierten randomisierten Kontroll-DNS an das Zielprotein Lysozym sowie an die Kontroll-Proteine Extrazellulärsignal-regulierte Kinase 2 (ERK2) und die Cytohesin1Sec7 Domäne (Cyt1Sec7) in einem Filterretentionstest (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest) untersucht.

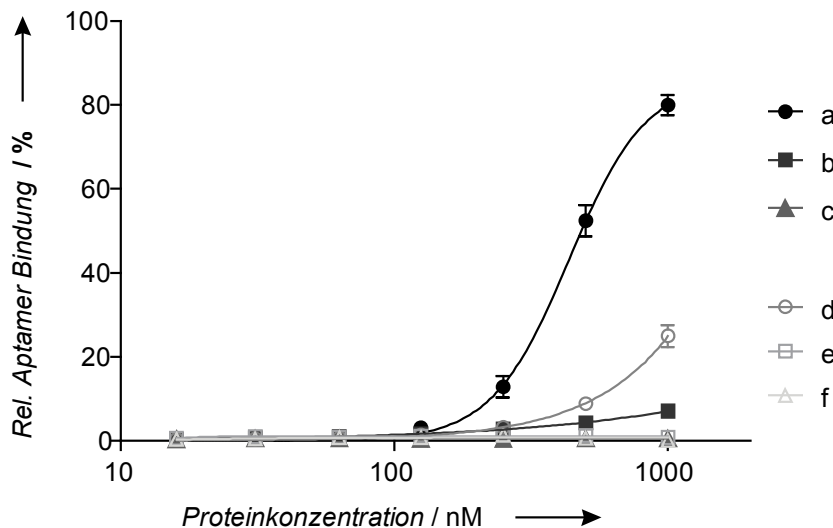


Abbildung 8. Lysozym-Aptamer mit 5'-Amino-Modifikation (APT, a-c) band in der Filterretention selektiv an Lysozym, eine randomisierte Kontroll-DNS mit 5'-Amino-Modifikation (d-f) zeigte deutlich weniger Affinität an Lysozym. Filterretentionsdaten von APT und randomisierter Kontroll-DNS an unterschiedliche Proteine (siehe 5.4. Filterretention). a) Bindung von APT an Lysozym b) Bindung von APT an ERK2 c) Bindung von APT an Cyt1Sec7 d) Bindung der randomisierten Kontroll-DNS an Lysozym e) Bindung der randomisierten Kontroll-DNS an ERK2 f) Bindung der randomisierten Kontroll-DNS an Cyt1Sec7.

Es zeigte sich, dass APT im sub-mikromolaren Bereich an Lysozym bindet (Abbildung 8 a), während die Bindung an ERK2 und Cyt1Sec7 vernachlässigbar gering war (Abbildung 8 b und c). Die randomisierte Kontroll-DNS zeigte im Vergleich zu APT deutlich niedrigere Affinität an Lysozym (Abbildung 8 d), für die anderen Proteine wurde keine Bindung bis zu einer Konzentration von 1 μ M gemessen (Abbildung 8 e und f). APT mit 5'-Amino-Modifikation war also durchaus für den Einsatz in dem Lysozym-Apta-Sensor geeignet. Damit wurde die Konzentrationsbestimmung über Impedanz-Messungen der Elektrode möglich.^[111]

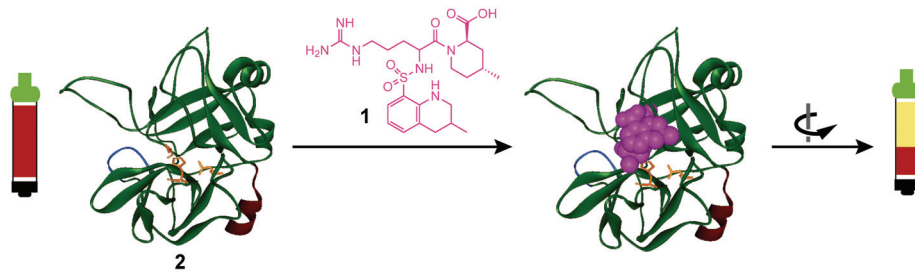
4.2. Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen

Mit dem oben beschriebenen Lysozym-Apta-Sensor ließ sich die Konzentration des Zielproteins bestimmen. Über die enzymatische Aktivität und damit die Potenz dieses Proteins in der Lösung, weiterhin Biokatalyse zu betreiben, sagte das Testsystem nichts aus. Die Quantifizierung von zum Beispiel Enzymen der Gerinnungskaskade ist aufgrund schneller Inaktivierung durch intrinsische Antagonisten oder partielle Denaturierung eine Herausforderung. Für Thrombin und aktiviertes Protein C (APC) gab es, bis zur Einführung der im Folgenden vorgestellten Methode, kein diagnostisches Testsystem zur direkten Messung der amidolytischen Aktivität dieser an dem Gerinnungsprozess beteiligten Proteine. Gerade hier ist aber die Überwachung der Enzym-Konzentration im Blut besonders wichtig, da eine nicht ausreichende Menge an Thrombin im Falle von Operationen zu massiven Blutungen führen kann.^[112] Andererseits kann eine erhöhte Konzentration von Thrombin zu Ischämien und damit zu Thrombosen, Embolien und Herzinfarkten führen.^[102] Da die zeitnahe Beobachtung der Gerinnungsfaktoren bisher nicht möglich war, wurde ein Apta-Sensor mit dem Namen Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen (*oligonucleotide-based enzyme capture assay*, OECA) entwickelt, der die Quantifizierung der katalytischen Aktivität von Enzymen aus komplexen Matrizen wie humanem Vollblut realisierte.

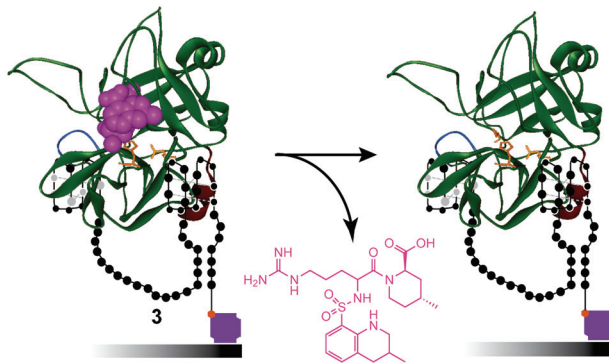
Für diesen Apta-Sensor wurden die Aptamere, welche die Zielproteine erkennen, in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Diese Platten konnten über einfache Inkubation mit Proteinen wie Streptavidin beschichtet werden. Die Aptamere wurden am 3'-Ende mit Biotin funktionalisiert. Die Interaktion von Biotin mit Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* ist eine der stärksten nicht kovalenten Interaktionen von Biomolekülen.^[113] Dadurch wurden die Aptamere über ihren Biotin-Anker auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte festgehalten. Die Blutproben mit den zu quantifizierenden Enzymen, Thrombin und APC, wurden mit ihrem jeweiligen reversiblen Inhibitor ihres aktiven Zentrums, Argatroban beziehungsweise Aprotinin, inkubiert (Abbildung 9 a). Damit wurde die Inaktivierung der Enzyme durch physiologische Inhibitoren verhindert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile des Vollbluts wurde das verbleibende Plasma in die Mikrotiterplatten gegeben. Die spezifischen Aptamere erkannten das mit dem entsprechenden Inhibitor in einem Komplex stehende Enzym und hielten es auf der Oberfläche fest. Die Aptamere besaßen aufgrund der hohen lokalen Konzentration auf der Oberfläche eine höhere Affinität als die Inhibitoren, die sich durch Waschen entfernen ließen (Abbildung 9 b). Die Quantifizierung der amidolytisch aktiven Proteine erfolgte durch Zugabe eines fluorogenen Peptid-Substrates, das durch enzymatische Spaltung seinen *Quenching*-Effekt verlor und damit über eine Standard-Kurve die Kalkulation der Konzentration an katalytisch aktivem Enzym in der Blutprobe ermöglichte (Abbildung 9 c). Alle über die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen hinausgehenden Experimente zu dem Oligonukleotid-basierten Ergreifen von Enzymen wurden von unseren

Kooperationspartnern um Bernd Pötzsch vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusion des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.^[20-21]

a)



b)



c)

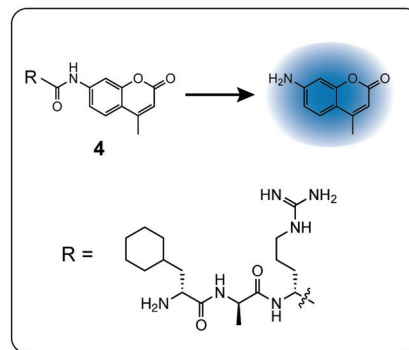


Abbildung 9. Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen ermöglichte die Quantifizierung der katalytischen Aktivität von Proteinen aus komplexen Matrizen. Illustration des generellen Prinzips dieses Apta-Sensors für Thrombin. a) Vollblut aus Patienten im Citratpuffer mit einer unbekanntem Konzentration amidolytisch aktivem Thrombin (2) wurde mit Argatroban (1), dem reversiblen Inhibitor des aktiven Zentrums, inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile des Blutes wurden abgetrennt. b) Das verbleibende Plasma wurde auf Mikrotiterplatten mit Streptavidinoberfläche, auf denen das Thrombin-bindende Aptamer HD1-22-bio (3) immobilisiert wurde, gegeben. Das Aptamer hielt das Thrombin, dessen aktives Zentrum mit dem Inhibitor Argatroban geschützt ist, in der Mikrotiterplatte. Der Inhibitor wurde durch Waschen entfernt. c) Die Menge an nun wieder amidolytisch aktivem Thrombin konnte durch enzymatische Spaltung des fluorogenen Peptid-Substrates I-1140 (4) gemessen werden. PDB-Datei: 1DWC. Abbildung aus Müller et al.^[20]

4.2.1. Bindung von HD1-22 und HS02-52G an Zielproteine

Das oben beschriebene Prinzip des Oligonukleotid-basierten Ergreifens von Enzymen wurde für die Serin-Proteasen der Blutgerinnungskaskade Thrombin und aktiviertes Protein C (APC) angewandt. Die hierfür eingesetzten Aptamere waren zum einen das bivalente DNS-Aptamer HD1-22, welches aus den Aptameren HD1 und HD22 besteht und gleichzeitig Exosite I und Exosite II von Thrombin bindet.^[63] Zum anderen wurde das DNS-Aptamer HS02-52G, das die basische Exosite von APC erkennt, verwendet.^[65] Für den Einsatz in dem Aptamersensor wurden die Oligonukleotide am 3'-OH biotinyliert, was die Aptamere HD1-22-bio und HS02-52G-bio ergab. Die 3'-OH Position wurde gewählt, da sich in vorausgegangenen Studien gezeigt hatte, dass eine Modifikation am 5'-OH von HD1, dem Baustein von HD1-22, in einer Reduktion der Aptamer-Aktivität resultierte.^[87b] Um eine Funktion des OECA-Sensors zu gewährleisten, mussten HD1-22-bio und HS02-52G-bio in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors, Argatroban für Thrombin und Aprotinin für APC, an das Protein binden.

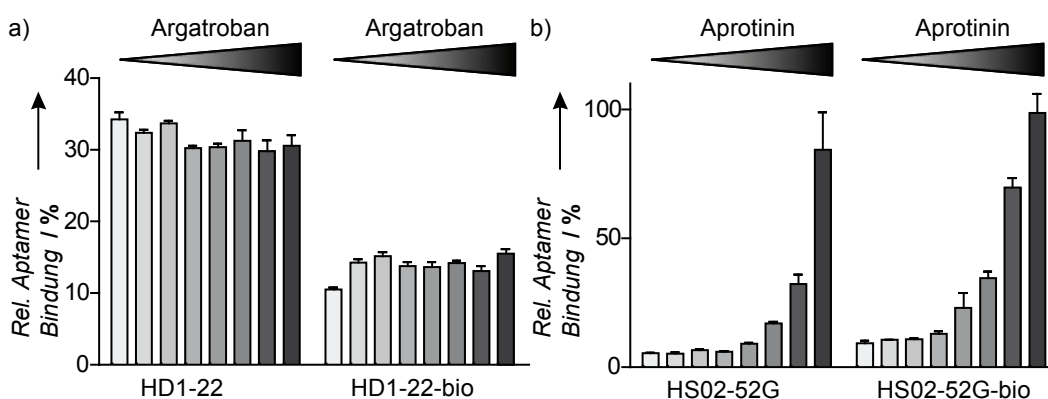


Abbildung 10. Argatroban hatte keinen Einfluss auf die Bindung von HD1-22 mit und ohne Biotinylierung an Thrombin. Aprotinin steigerte das Affinitäts-Signal von HS02-52G mit und ohne Biotinylierung an APC. a) Bindung von HD1-22 und HD1-22-bio an 5 nM Thrombin (K_d HD1-22 \sim 2 nM, siehe Abbildung 18) im Filterretentionstest in Abwesenheit und Gegenwart von Argatroban (Konzentrationen von 3 bis 200 μ M) b) Bindung von HS02-52G und HS02-52G-bio an 5 nM APC (K_d HS02-52G \sim 0,5 nM^[65]) im Filterretentionstest in Abwesenheit und Gegenwart von Aprotinin (Konzentrationen von 0,063 bis 63 μ M).

Aus diesem Grund wurden die Bindungseigenschaften der Wildtyp- und biotinylierten Aptamere in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-Konzentrationen im Filterretentionstest (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest) untersucht. Hier zeigte sich, dass die Affinität von HD1-22 durch die Biotinylierung zwar reduziert wurde, aber noch ausreichende Bindung an Thrombin vorhanden war und sich die Bindungseigenschaften in Gegenwart des Inhibitors Argatroban nicht maßgeblich veränderten (Abbildung 10 a). Die Biotinylierung und der Einsatz von Argatroban waren für die Verwendung in dem Thrombin-Apta-Sensor geeignet. Im Fall von HS02-52G stieg die Affinität für APC durch die Biotinylierung von ca. 5 % auf ca. 10% an, allerdings erhöhte sich das

Bindungssignal stark bei der Zugabe des Peptid-Inhibitors Aprotinin (Abbildung 10 b).

4.2.2. Bindung von HD1-22 und HS02-52G an Aprotinin

Es wurde oben gezeigt, dass der Peptid-Inhibitor des aktiven Zentrums der Proteinase APC Aprotinin im Filterretentionstest zusammen mit dem Enzym das Bindungssignal des Aptamers HS02-52G erhöhte. Um zu klären, ob es sich dabei um einen allosterischen Effekt von Aptamer, Enzym und Inhibitor oder um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotiden und dem Peptid handelte, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors ohne Enzym mit den biotinylierten und Wildtyp-Varianten von HS02-52G und dem nicht an APC bindenden Thrombin-Aptamer HD1-22 im Filterretentionstest (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest) eingesetzt.

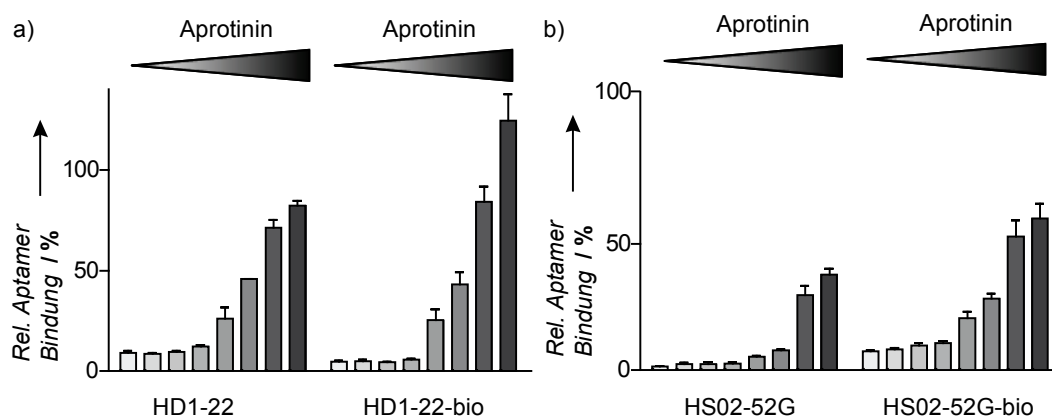


Abbildung 11. HD1-22 und HS02-52G mit und ohne Biotinylierung banden an Aprotinin. a) Bindung von HD1-22 und HD1-22-bio an Aprotinin im Filterretentionstest in Konzentrationen 0 bis 63 µM b) Bindung von HS02-52G und HS02-52G-bio an Aprotinin im Filterretentionstest in Konzentrationen von 0 bis 63 µM.

Beide Aptamere ließen mit und ohne Biotinylierung eine konzentrationsabhängige Bindung an Aprotinin erkennen (Abbildung 11). Es war davon auszugehen, dass das Peptid unspezifische Wechselwirkungen mit Oligonukleotiden eingeht. Das Bindungssignal für APC, aber ohne Aprotinin (Abbildung 10 b, hellster Balken) mit ca. 5 % für HS02-52G war höher als die Hintergrundbindung ohne Enzym und Peptid (Abbildung 11 b, hellster Balken) mit ca. 1,5 %. Es war also eine Bindung an APC erkennbar, die durch die Zugabe von Aprotinin nicht reduziert wurde. Gleiches galt für HS02-52G-bio. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Bindung von HS02-52G und APC nicht durch Aprotinin gestört wurde. Damit konnte auch diese Kombination aus biotinyliertem Aptamer und Inhibitor erfolgreich in dem APC-Apta-Sensor eingesetzt werden.

4.3. TINAs

Die Modifikationen durch verdrehte interkalierende Nucleinsäuren (*Twisted intercalating nucleic acids*, TINAs) in Oligonucleotiden können die thermische Stabilität von DNS-Duplexen erhöhen und die Ausbildung von DNS-Triplexen ermöglichen.^[114] Weiterhin wurden sie verwendet, um die Stabilität von G-Quadruplex-formenden Monomeren und Multimeren zu steigern. TINAs bestehen meist aus Elementen, welche die freie Rotation der anderen Gruppen ermöglichen, einer Einheit zur Interkalation in Duplexe und einer Komponente, die π - π -Wechselwirkungen mit benachbarten Nucleobasen eingehen kann (Abbildung 12).^[115]

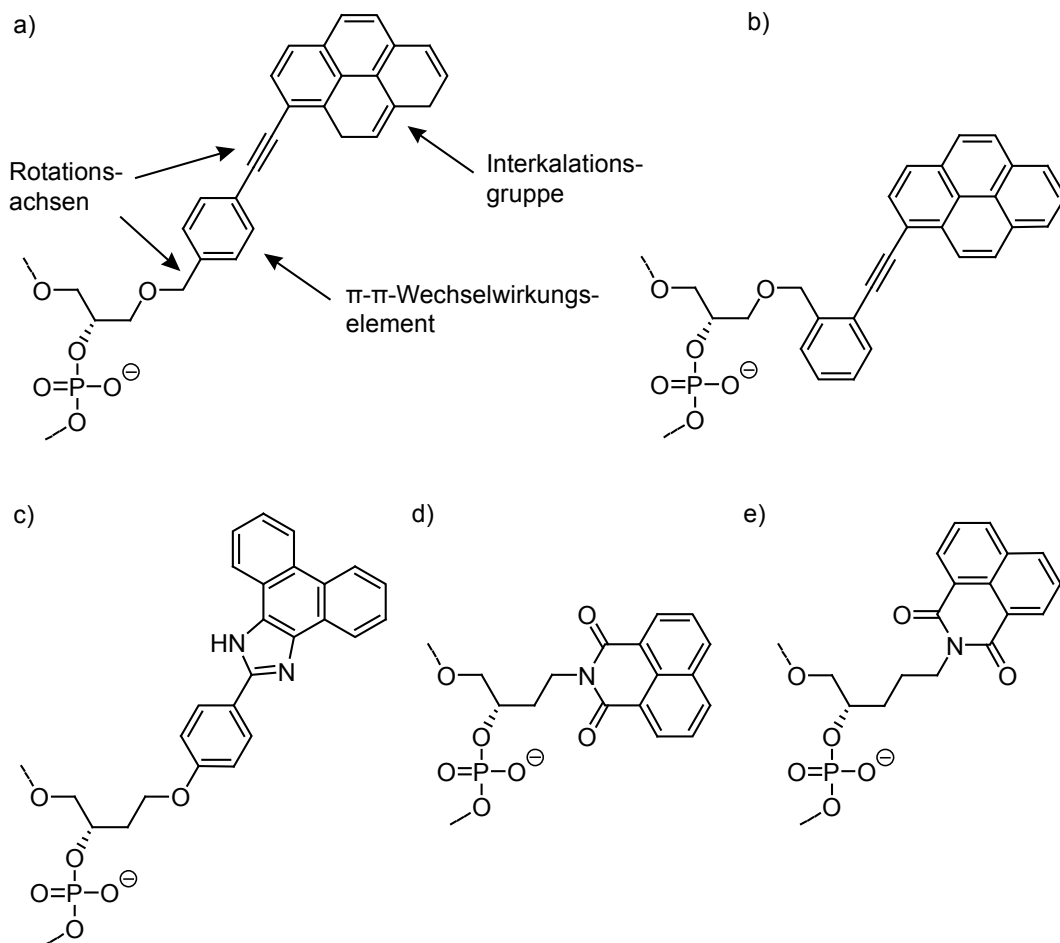


Abbildung 12. Struktur von interkalierenden Nucleinsäuren und verdrehten interkalierende Nucleinsäuren (TINAs). a) (R)-1-O-[4-(1-pyrenylethynyl)phenylmethyl]glycerol (para-TINA, P) mit der Markierung der Strukturelemente der TINA-Modifikationen b) (R)-1-O-[2-(1-pyrenylethynyl)phenylmethyl]glycerol (ortho-TINA, O) c) (S)-4-(4-(1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl)phenoxy)butan-1,2-diol (Amany, Y) d) (S)-4-(1,8-Naphtalimido)-1,2-butanediol (K-Modifikation) e) (S)-5-(1,8-Naphtalimido)-1,2-pentanediol (M-Modifikation).

Wichtige Gen-Regionen, wie der Promotor des KRAS-Gens, besitzen G-Quadruplex-Strukturen. In kürzlich publizierten Studien wurde das Sequenzelement des G-Quadruplexes mit TINAs modifiziert, dieses Oligonukleotid imitierte damit die Promotorstruktur und zeigte antiproliferierende Wirkung, was auf eine Inhibition der Promotor-bindenden Proteine schließen lässt.^[116] In einer anderen Untersuchung hatte der Einsatz von TINAs in dem Aptamer T30177 gegen die HIV-1-Integrase eine erhöhte metabolische Aktivität von HIV-infizierten Zellen zur Folge.^[81]

Bisher konnte für TINA-Modifikationen nicht gezeigt werden, dass ihr Einsatz in G-Quadruplexen direkt die Affinität von Oligonukleotiden zu ihren Zielproteinen erhöht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Aptamere HD1, HD22 und C10.36 mit TINA-Molekülen modifiziert und anschließend auf ihre Bindung beziehungsweise Aktivität hin untersucht. Diese Aptamere besitzen G-reiche Sequenzen und bilden potentiell G-Quadruplex-Strukturen aus. Die eingesetzten Bausteine sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Amany-Modifikation wurde in der bisherigen Literatur und damit auch in dieser Arbeit mit Y abgekürzt.^[117] Da dieser Buchstabe aber bereits als Abkürzung für Pyrimidin-Basen verwendet wird, sollte hier in Zukunft eine andere Nomenklatur verwendet werden.

4.3.1. HD1-TINAs

HD1 ist ein DNS-Aptamer mit 15 Nucleobasen und einem antiparallelen G-Quadruplex, es besitzt eine Affinität von ca. 100 nM zu der Exosite I von Thrombin.^[118] Die TINA-Modifikationen wurden an unterschiedlichen Positionen des HD1-Moleküls in die Sequenz eingebracht (Abbildung 13). Wurde die Modifikation zusätzlich zur Wildtyp-Sequenz eingeschoben, wurde sie mit i wie *insertion* markiert, wurde eine Nucleobase durch die Modifikation ausgetauscht, wurde sie mit r wie *replacement* bezeichnet.

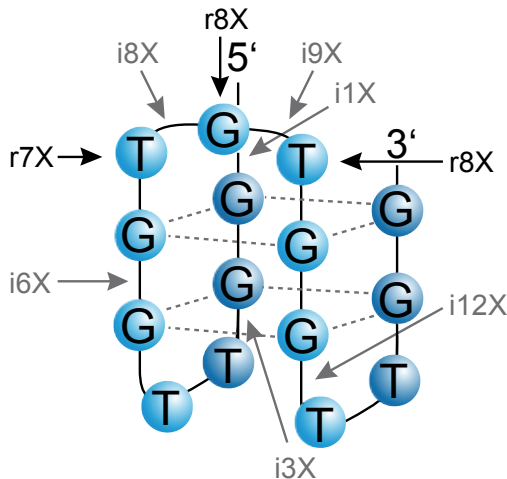


Abbildung 13. TINA-Modifikationen wurden an unterschiedlichen Positionen in die HD1-Sequenz eingeführt. Schematische Darstellung von HD1 mit den Positionen, an denen TINA-Modifikationen hinzugefügt wurden. Der Einschub einer TINA-Modifikation in die Wildtyp-Sequenz ist mit i (*insertion*), der Austausch einer Nucleobase mit r (*replacement*) gekennzeichnet.

4.3.1.1. Bindung und Koagulationszeit von HD1-i-TINAs

Unsere Kooperationspartner um Erik B. Pedersen vom Nucleic Acids Center der University of Southern Denmark synthetisierten zunächst HD1-Moleküle mit in der Nähe des G-Quadruplexes in die Sequenz eingeschobenen TINA-Modifikationen (Abbildung 13). Es wurden die Affinität der Aptamere zu Thrombin im Filterretentionstest und die biologische Aktivität mittels der relativen Koagulationszeit von humanem *pool*-Plasma in Anwesenheit der Oligonucleotide ermittelt. Die Durchführung der Koagulationszeitmessungen erfolgte durch Tina Kupper vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusion des Universitätsklinikums Bonn, unter Planung und Auswertung durch Falk Rohrbach. Weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest und 7.7. Koagulationszeit.

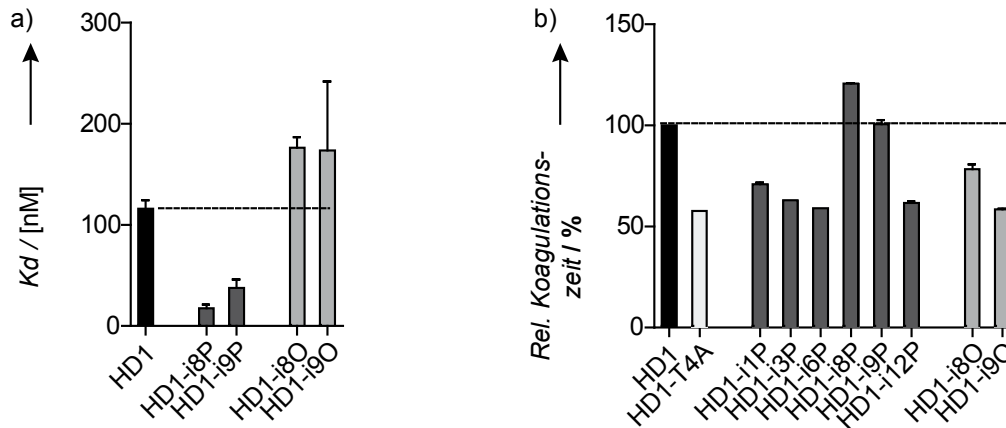


Abbildung 14. HD1-i-para-TINAs zeigten erhöhte Affinität zu Thrombin und geringfügige Koagulationszeitverlängerung, HD1-i-ortho-TINAs wiesen geringe Affinität und verkürzte Koagulationszeit im Vergleich zu unmodifiziertem HD1 auf. a) K_d der HD1-i-TINAs, ermittelt durch Filterretentionstests mit Thrombin-Konzentrationen von 1 bis 1000 nM. b) Relative Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1 modifiziert mit i-TINAs. Die relative Koagulationszeit von humanem *pool*-Plasma wurde auf die Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1 normalisiert und ist in % dargestellt.

Bei den Affinitätsbestimmungen wurde deutlich, dass das Einschleiben von para-Tina-Modifikationen (P) in die Nukleobasensequenz an Position 8 oder 9 die Bindung verstärkte, während das Einfügen von ortho-TINAs (O) an dieselben Positionen eine Reduktion der Affinität bewirkte (Abbildung 14 a). Ein ähnlicher Trend zeigte sich für die Bestimmungen der Koagulationszeiten (Abbildung 14 b). Einschübe von para-TINA-Modifikationen an Position 1, 3, 6 oder 12 reduzierten zwar die Koagulationszeit auf das Niveau der Punktmutante HD1-T4A, welche keine Affinität zu Thrombin bis 1 μ M aufwies (Abbildung 33 c), aber an Position 8 verlängerte sich die Gerinnungszeit und an Position 9 blieb sie auf dem Level von HD1. Für die ortho-TINAs verringerte sich die Koagulationszeit. Die Region um die Positionen 8 und 9 in HD1 schien also geeignet für die Einführung von para-TINAs.

4.3.1.2. Bindung und Schmelzpunkte von HD1-r-TINAs

Oben wurden die Effekte von eingeschobenen TINAs auf Affinität und Gerinnungseigenschaften von HD1 untersucht. Zwar konnten geringfügige Verbesserungen dieser Eigenschaften für i-para-TINAs in der Region um Position 8 erzielt werden, doch der Einschub der Modifikationen in die Aptamersequenz könnte eine Veränderung der Gesamtstruktur und damit die Verschiebung der mit Thrombin wechselwirkenden Gruppen zur Folge haben. Wenn hingegen Basen, die nicht an der Bindung oder den sturkturgebenden Motiven beteiligt sind, durch die TINA-Modifikationen ausgetauscht würden, könnte dies einen positiven Einfluss auf die stabilisierende Wirkung auf den G-Quadruplex haben. Daher synthetisierten unsere Kooperationspartner um Erik B. Pedersen vom Nucleic Acids Center der University of Southern Denmark HD1-Varianten mit TINA-Modifikationen, welche in der ungepaarten Schleife der Aptamersequenz an Position 7,8 und 9 Nukleobasen ersetzen (Abbildung 13). Diese Basen sind nicht an der Interaktion von HD1 mit Thrombin beteiligt.^[19]

Es wurden Affinitätsbestimmungen und Untersuchungen zur thermischen Stabilität durchgeführt (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest und 7.6. Schmelzpunktbestimmung für G-Quadruplex Oligonukleotide). Die Bindungsstudien ergaben, dass der Austausch des G an Position 8 durch die para-TINA- und Amany-Modifikationen zu einer erheblichen Verstärkung der Bindung an Thrombin führte (Abbildung 15). Die ortho-TINAs ließen zwar ebenfalls eine leichte Steigerung der Affinität erkennen, hier wies Position 8 allerdings die geringste Bindungserhöhung auf. Die Schmelzpunkte der HD1-Varianten korrelierten mit den Affinitätsdaten – die Aptamere mit verstärkter thermischer Stabilität verfügten auch über eine erhöhte Affinität (Tabelle 1). Die Varianten mit geringeren Schmelzpunkten als das Wildtyp-Aptamer, HD1-r9P und HD1-r9Y, zeigten wiederum weniger Bindung. Einzig HD1-r9O hatte mit 65,7 °C einen stark erhöhten Schmelzpunkt, der sich nicht in Relation zu den Affinitätsdaten bringen ließ. Insgesamt war zu erkennen, dass die Verbesserung der thermischen Stabilität durch die r-TINA-Modifikationen eine erhöhte Affinität zu Thrombin zur Folge hatte. Dies galt besonders für HD1-r8P und HD1-r8Y.

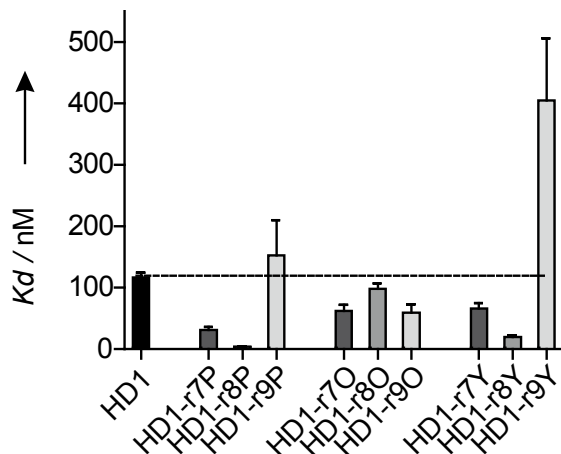


Abbildung 15. r-para-TINA- und r-Amany-Modifikationen an Position 8 in HD1 verbesserten die Affinität an Thrombin. K_d der HD1-r-TINAs, ermittelt durch Filterretentionstests mit Thrombin-Konzentrationen von 1 bis 1000 nM.

Aptamer	$T_m / ^\circ\text{C}$
HD1	36,1
HD1-r7P	38,6
HD1-r8P	52,4
HD1-r9P	29,8
HD1-r7O	45,0
HD1-r8O	49,7
HD1-r9O	65,7
HD1-r7Y	45,6
HD1-r8Y	49,3
HD1-r9Y	27,3

Tabelle 1. Die Affinitätsbestimmungen und die Schmelzkurven wiesen eine Korrelation auf. Schmelzpunktbestimmungen der HD1-r-TINAs bei einer Konzentration von 10 μM in 1x PBS pH 7,4. TINA-Varianten, die eine höhere Affinität im Filterretentionstest (Abbildung 15) besitzen, zeigten meist auch eine höhere thermische Stabilität.

4.3.1.3. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie von HD1-r-TINAs

Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie beschreibt das Absorptionsverhalten rechts- und linksdrehend zirkular polarisierter Strahlung in einem optisch aktiven Material. CD-Spektren können Auskunft über Präsenz und die Art (parallele oder antiparallele Anordnung) einer G-Quadruplex-Struktur in einem Oligonukleotid geben.^[120] Die Kristallstruktur von HD1 weist eine antiparallele G-Quadruplex-Anordnung auf.^[60] Das CD-Spektrum des Aptamers beinhaltet charakteristische Maxima bei ca. 290 und 250 nm und ein Minimum bei ca. 265 nm.^[121]

Diese typischen Maxima und Minima konnten bei der Aufnahme der Spektren von HD1 und HD1-r-TINAs bestätigt werden (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie). Die Messung der Punktmutante HD1-T4A ergab ein mit HD1 identisches CD-Spektrum, die G-Quadruplex-Anordnung schien kongruent zu sein (Abbildung 16 a).

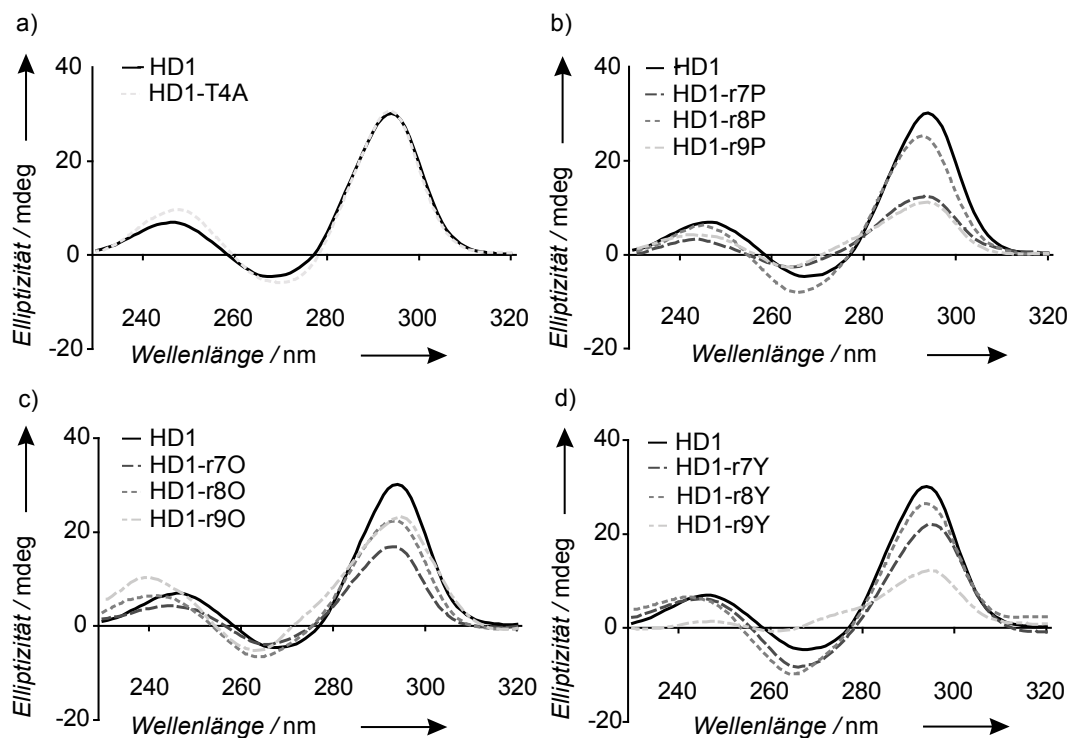


Abbildung 16. r-TINA-Modifikationen an Position 8 in HD1 bildeten einen antiparallelen G-Quadruplex ähnlich zu unmodifiziertem HD1. CD-Spektren der HD1-r-TINAs (50 μ M) in 1xPBS. Das Elliptizitäts-Maximum von HD1 bei ca. 290 und 250 nm und das Elliptizitäts-Minimum bei ca. 265 nm deuteten auf eine antiparallele G-Quadruplex-Struktur hin. Bei großer Übereinstimmung der Spektren mit dem von HD1 war von einer antiparallelen G-Quadruplex-Struktur auszugehen. a) HD1 und HD1-T4A b) r-para-TINAs c) r-ortho-TINAs d) r-Amany-TINAs.

Die para-TINA-Modifikation zeigte nur für den Ersatz der Nukleobase 8 ein Spektrum mit den charakteristischen Peaks in ausreichender Höhe. Bei HD1-r7P und HD1-r9P schien die para-TINA Gruppe die Ausbildung des G-Quadruplexes zu stören (Abbildung 16 b). Für die ortho-TINAs wirkte sich die Modifikation an

den unterschiedlichen Positionen ähnlich aus, alle Spektren zeigten zwar noch die markanten Maxima und Minima, allerdings in schwächerer Ausprägung (Abbildung 16 c). Es war davon auszugehen, dass der G-Quadruplex hier zwar ausgebildet, aber leicht gestört war. Die CD-Spektren der Amany-Modifikationen waren wieder positionsabhängig, der Ersatz der Nukleobasen an Position 7 und 8 schien die Formierung des G-Quadruplexes kaum zu stören, während das Spektrum von HD1-r9Y bewies, dass hier kein G-Quadruplex gebildet wurde.

Diese Strukturuntersuchungen verdeutlichten, dass die nach den Bindungsstudien und Schmelzpunktbestimmungen favorisierten Varianten HD1-r8P und HD1-r8Y eine intakte G-Quadruplexstruktur besaßen.

4.3.1.4. Koagulationszeit und partielle Thromboplastinzeit von HD1-r-TINAs

Neben den Eigenschaften thermische Stabilität, G-Quadruplex-Struktur und Affinität der HD1-Varianten mit r-TINA-Modifikationen war die biologische Aktivität, das heißt die Verlängerung der Zeitspanne bis zur Gerinnungsbildung, dieser Aptamere von großem Interesse. Daher wurden die Oligonukleotide auf die Steigerung der Koagulationszeit und der partiellen Thromboplastinzeit hin analysiert. Die Messung der partiellen Thromboplastinzeit ist ein zweistufiges Testsystem zur Analyse der Thrombin-Inhibition in Plasma. Im Gegensatz zur Koagulationszeit wurde das Plasma hier nicht mit Thrombin versetzt, sondern die Blutgerinnungskaskade durch Ellagsäure über die Kontaktaktivierung (siehe 2.4.1. Die Gerinnungskaskade) in Gang gesetzt, damit die Umsetzung von Prothrombin zu Thrombin gestartet und schließlich die Koagulationszeit gemessen. Die Durchführung der Koagulations- und partiellen Thromboplastinzeit-Messungen erfolgte durch Tina Kupper vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusion des Universitätsklinikums Bonn, unter Planung und Auswertung durch Falk Rohrbach. Weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.7. Koagulationszeit und 7.8. partielle Thromboplastinzeit.

Bei der Bindung und Schmelzpunktbestimmung hatten sich die Aptamere HD1-r8P und HD1-r8Y als besonders vielversprechend gezeigt. In Bezug auf die Koagulationszeit bestätigte sich dieser Trend für HD1-r8P, dieses Aptamer wies eine Verlängerung des Gerinnungszeitpunktes auf ca. 180 % des Wertes des Wildtyp-Aptamers auf (Abbildung 17 a). HD1-r8Y konnte ebenfalls eine leichte Steigerung der Koagulationszeit erreichen. Die ortho-TINA-Modifikationen lagen mit ihren Gerinnungszeiten auf dem Niveau von unmodifiziertem HD1. Die partielle Thromboplastinzeit wurde durch alle Modifikationen an Position 8 gesteigert, wobei nur HD1-r8P einen Wert von ca. 125 % des unmodifizierten Aptamers erreichte (Abbildung 17 b).

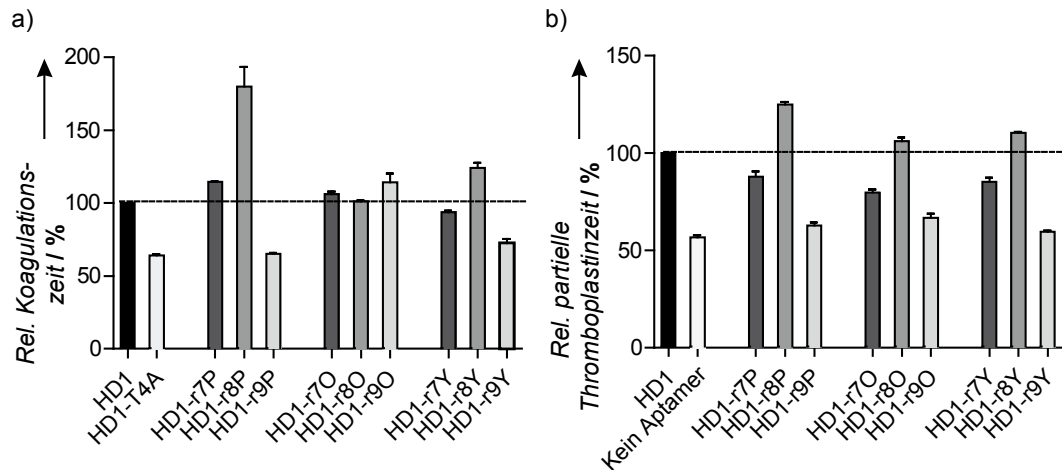


Abbildung 17. r-TINA-Modifikation an Position 8 in HD1 verbesserten dessen gerinnungshemmende Eigenschaften. a) Relative Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1 modifiziert mit r-TINAs. Die relative Koagulationszeit von humanem *pool*-Plasma wurde auf die Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1 normalisiert und ist in % dargestellt. b) Relative partielle Thromboplastinzeit in Anwesenheit von 2 µM HD1 modifiziert mit r-TINAs. Die relative partielle Thromboplastinzeit von humanem *pool*-Plasma wurde auf die partielle Thromboplastinzeit in Anwesenheit von 2 µM HD1 normalisiert und ist in % dargestellt.

Für beide Messungen, Koagulationszeit und partielle Thromboplastinzeit, wurde deutlich, dass eine Modifikation an Position 9 einen negativen Effekt auf die biologische Aktivität der Oligonukleotide hatte. Die Werte hierfür lagen für die Koagulationszeit auf einer ähnlichen Stufe wie für die Punktmutante HD1-T4A und für die partielle Thromboplastinzeit sogar im Bereich der Messungen ohne Aptamer. Einzig HD1-r9O fiel bei der Koagulationszeit, wie schon für die Schmelzpunktbestimmung, aus dem Trend der verschlechterten Eigenschaften für Position 9 heraus und zeigte eine schwache Verlängerung der Gerinnungszeit, aber wiederum eine deutliche Verschlechterung der partiellen Thromboplastinzeit. Die Varianten mit einer messbaren Verbesserung der biologischen Aktivität durch den Ersatz einer Nucleobase durch eine TINA-Modifikation waren HD1-r8P und HD1-r8Y, was im Einklang mit den Ergebnissen der Affinität, G-Quadruplex-Struktur und thermischen Stabilität stand.

4.3.1.5. Bindung, Koagulationszeit und partielle Thromboplastinzeit von HD1-22-r-TINAs

HD1-22 ist ein bivalentes Aptamer bestehend aus HD1 und HD22. Es erkennt mit seinem HD1-Teil die Exosite I, welches die Inhibition von Fibrinogenbindung und damit Gerinnungshemmung zur Folge hat, und mit der HD22-Gruppe die Exosite II von Thrombin.^[63] HD1 hat eine K_d von ca. 100 nM (siehe Abbildung 33 a und ^[118]), HD22 besitzt eine K_d von ca. 1 nM (siehe Abbildung 29 und ^[61]). HD1-22 kombiniert die hohe Affinität von HD22 an Exosite II und die Inhibitionsaktivität für Exosite I des vergleichsweise weniger affinen HD1 und stellt damit einen potenten aptamer-basierten Gerinnungsinhibitor dar. In den oben vorgestellten Experimenten wurde gezeigt, dass der Ersatz der Nukleobase 8 in HD1 durch eine para-TINA oder Amany-Gruppe dessen Affinität, thermische Stabilität und biologische Aktivität verbesserte. Es blieb zu klären, ob diese gesteigerten Eigenschaften auch die Aktivität des HD1-22 Aptamers intensiviert.

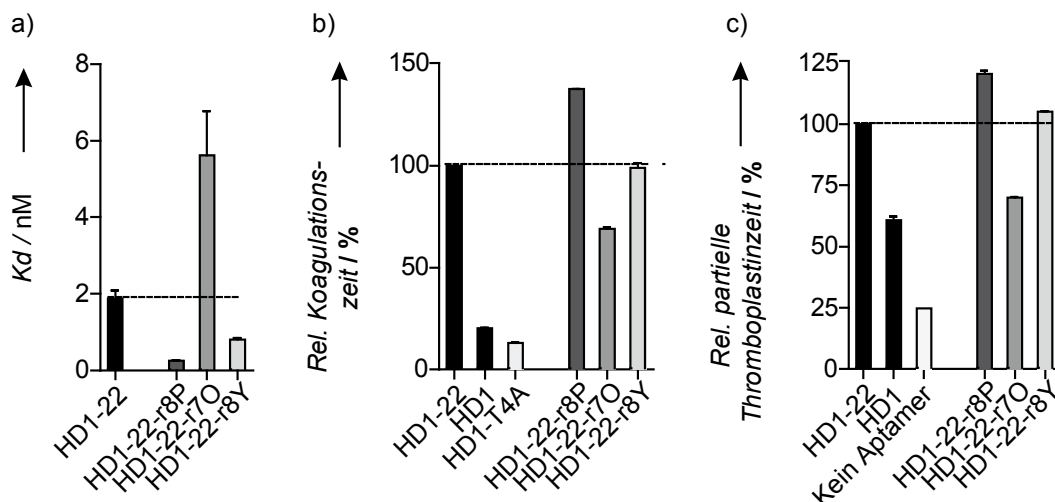


Abbildung 18. HD1-22-r8P zeigte eine hohe Affinität zu Thrombin und verlängerte Koagulations- und partiellen Thromboplastinzeiten im Vergleich zu HD1-22.

a) K_d der HD1-22-r-TINAs, ermittelt durch Filterretentionstests mit Thrombin-Konzentrationen von 0,0625 bis 64 nM. b) Relative Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1-22 modifiziert mit r-TINAs. Die relative Koagulationszeit von humanem *pool*-Plasma wurde auf die Koagulationszeit in Anwesenheit von 250 nM HD1-22 normalisiert und ist in % dargestellt. c) Relative partielle Thromboplastinzeit in Anwesenheit von 2 μ M HD1-22 modifiziert mit r-TINAs. Die relative partielle Thromboplastinzeit von humanem *pool*-Plasma wurde auf die partielle Thromboplastinzeit in Anwesenheit von 2 μ M HD1-22 normalisiert und ist in % dargestellt.

Hier wurden nun diese zwei Varianten und als Kontrolle die Modifikation HD1-r7O, die in den oben gezeigten Experimenten wenig Veränderung der Aptamer-Eigenschaften zur Folge hatte, von unseren Kooperationspartnern um Erik B. Pedersen vom Nucleic Acids Center der University of Southern Denmark

in das HD1-22 Aptamer eingebaut und Affinität und biologische Aktivität der Oligonukleotide gemessen. Die Durchführung der Koagulations- und partiellen Thromboplastinzeitmessungen erfolgte durch Tina Kupper vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusion des Universitätsklinikums Bonn, unter Planung und Auswertung durch Falk Rohrbach. Für weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest, 7.7. Koagulationszeit und 7.8. partielle Thromboplastinzeit.

Die Varianten HD1-22-r8P und HD1-22-r8Y besaßen mit einer K_d von $0,25 \pm 0,02$ nM beziehungsweise $0,80 \pm 0,05$ nM eine erhöhte Affinität gegenüber Thrombin von Vergleich zu dem unmodifizierten HD1-22 mit $1,88 \pm 0,21$ nM (Abbildung 18 a). Das Kontroll-Aptamer HD1-22-r7O hingegen wies eine Verschlechterung der Bindungseigenschaften auf. Dies spiegelte sich auch in der biologischen Aktivität wider. Sowohl bei der Koagulations- als auch bei der partiellen Thromboplastinzeit verkürzte sich die Gerinnungszeit für HD1-22-r7O im Vergleich zu unmodifiziertem HD1-22 um jeweils ca. 30 Prozent (Abbildung 18 b und c). Durch die Amany-Modifikation änderten sich die Werte der biologischen Testsysteme trotz gesteigerter Affinität kaum. Nur für HD1-22-r8P verlängerte sich sowohl Koagulations- als auch partielle Thromboplastinzeit um ca. 40 beziehungsweise ca. 20 Prozent. Diese Variante verdeutlicht das Potential von TINA-Modifikationen, nicht nur die thermische Stabilität und folglich die biologische Aktivität von Duplex-Oligonukleotiden, sondern auch von G-Quadruplex-Aptameren zu verbessern.

4.3.2. HD22-TINAs

4.3.2.1. Bindung von HD22-Punktmutanten

HD22 ist ein G-reiches DNS-Aptamer, das mit hoher Affinität die Exosite II von Thrombin erkennt. In dem Strukturvorschlag von Tasset et al. bildet das Aptamer einen antiparallelen G-Quadruplex, bestehend aus zwei G-Tetraden (Abbildung 19 und 42 a).^[61] In einer aktuellen Studie zur Kristallstruktur von HD22 wurde eine Struktur mit nur einer G-Tetrade vorgestellt (Abbildung 42 b).^[62]

Diese Kristallstruktur stand zum Zeitpunkt des Designs der Experimente für die Doktorarbeit noch nicht zur Verfügung. Oben wurden TINA-Modifikationen in HD1 und damit in den Exosite-I-bindenden Baustein des bivalenten Aptamers HD1-22 erfolgreich eingebaut und steigerten dessen gerinnungsinhibitorische Eigenschaften. Daher lag es nahe, auch den G-Quadruplex von HD22 mit TINA-Modifikationen zu stabilisieren. Dafür wurden zunächst die Affinitäten von Punktmutanten des Aptamers zu Thrombin ermittelt, um Positionen zu bestimmen, die für die Bindung irrelevant sind und damit durch TINAs ersetzt werden konnten.

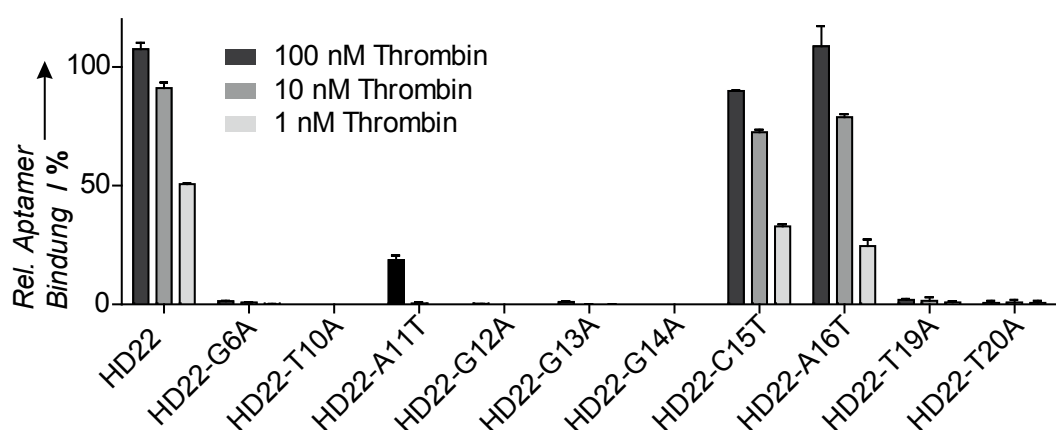


Abbildung 19. Die Mutationen C15T und A16T beeinflussten nicht die Affinität des HD22 Aptamers. Bindung von HD22 und HD22-Punktmutanten im Filterretentionstest an 100, 10 und 1 nM Thrombin. HD22-C15T und HD22-A16T hatten ähnliche Bindungseigenschaften wie unmodifiziertes HD22.

Im Filterretentionstest (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest) wurde deutlich, dass von den getesteten Punktmutanten nur die Alternation von C zu G an Position 15 und von A zu T an Position 16 die Bindungseigenschaften nicht störten. In vorausgegangenen Studien sind bereits weitere Punktmutanten untersucht worden. Dort wurde festgestellt, dass die Punktmutante G23A ebenfalls die Affinität nicht reduzierte.^[85]

4.3.2.2. Bindung von HD22-TINAs

Nachdem mit C15, A16 und G23 Positionen in HD22 identifiziert wurden, die gegen eine andere Base ausgetauscht werden konnten und trotzdem ihre Affinität zu Thrombin behielten, synthetisierten unsere Kooperationspartner um Erik B. Pedersen vom Nucleic Acids Center der University of Southern Denmark die unten aufgeführten TINA-Varianten. Positionen G6, T7 und G14 waren in den Bindungsstudien zu den Punktmutanten beziehungsweise von Mayer et al. als essentiell für die Bindung an Thrombin identifiziert worden.^[85] Zum Zeitpunkt der Synthese war allerdings nur der Strukturvorschlag von Tasset et al. verfügbar (siehe Abbildung 20).^[61] Da die Positionen G6, T7 und G14 in dieser Anordnung nicht am G-Quadruplex beteiligt waren, sondern in struktureller Nähe zu diesem standen und damit die Wahrscheinlichkeit, dass die TINA-Modifikation mit einer G-Tetrade interagiert, erhöht war, wurden zusätzlich diese Nukleobasen durch para-TINAs ersetzt.

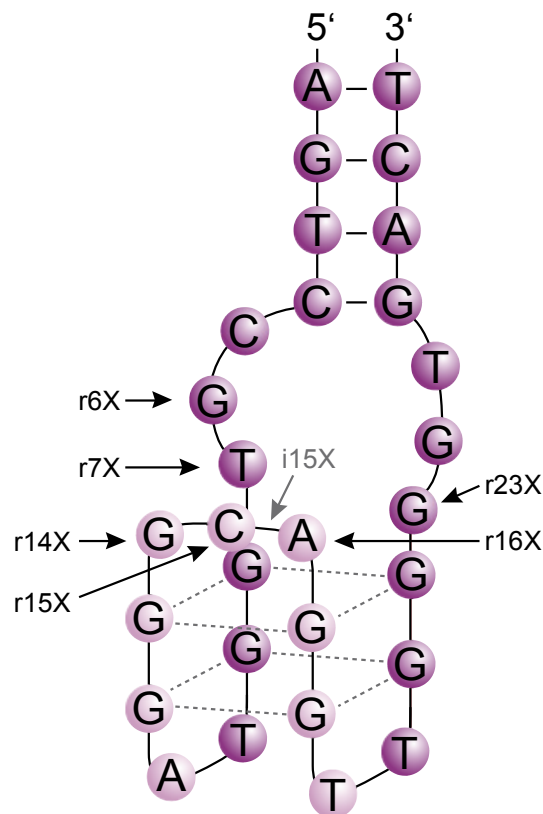


Abbildung 20. HD22 bildet nach Tasset et al. einen zweilagigen parallelen G-Quadruplex. Schematische Darstellung von HD22 nach ^[61]. Positionen, an denen TINA-Modifikationen hinzugefügt wurden, sind entsprechend markiert. Der Einschub einer TINA-Modifikation in die Wildtyp-Sequenz ist mit i (*insertion*), der Austausch einer Nukleobase mit r (*replacement*) gekennzeichnet.

Keine der HD22-TINA-Modifikationen zeigte im Filterretentionstest (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest) beim Vergleich mit der Wildtyp-Version ähnliche oder gar bessere Affinität zu Thrombin (Abbildung 21). Der Austausch von Nucleobasen durch die Poly-Benzpyren-Moleküle an den angegebenen Positionen schien die Bindung der Aptamere erheblich zu stören.

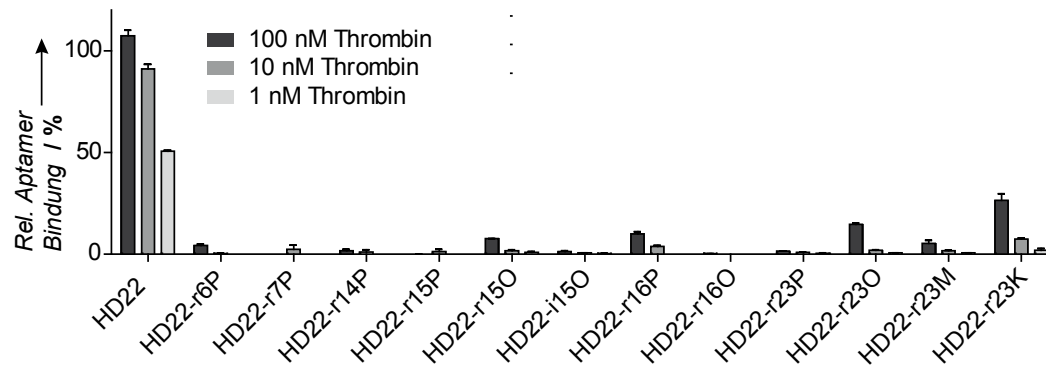


Abbildung 21. TINA-Modifikationen in HD22 führten zu einem Verlust der Bindungseigenschaft von HD22 zu Thrombin. Bindung von HD22 und HD22-TINAs im Filterretentionstest an 100, 10 und 1 nM Thrombin.

4.3.3. C10.36-TINAs

4.3.3.1. Bindung von C10.36-TINAs I

C10.36 ist die auf 36 Nukleotide verkürzte Variante des G-reichen DNS-Aptamers C10, das in einer Selektion gegen B-lymphoblastoide Suspensionszellen aus einem humanem Burkitt-Lymphom, sogenannte Ramos-Zellen, identifiziert wurde.^[38] Der Bindungspartner von C10.36 auf der Zelloberfläche ist bisher unbekannt. Das Aptamer bindet aber selektiv an Ramos-Zellen und zeigt weder Affinität zu primären B-Zellen, noch zu immortalisierten humanen T-Lymphozyten, humanen Brustkrebszellen oder Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms.^[39] Die Sequenz von C10.36 lässt vermuten, dass Basen 1 bis 8 und 29 bis 36 eine Stammschleife bilden. Der Bereich zwischen Position 9 und 24 besteht aus 12 Guanin- und 4 Thymin-Resten, was die Formierung eines G-Quadruplexes nahelegt.

Anfängliche Strukturvoraussagen favorisierten eine antiparallele Ausbildung mit 2 G-Tetraden, bei diesem Modell bestünde eine gewisse Strukturähnlichkeit mit dem zweilagigen antiparallelen G-Quadruplex des Thrombin-Aptamers HD1. Entsprechend dieses Strukturmodells wurden von unserem Kooperationspartner Jesper Wengel von der Abteilung Physik, Chemie und Pharmazie der University of Southern Denmark C10.36-Varianten, in denen Nukleobasen durch TINA-Modifikationen ausgetauscht waren, synthetisiert (Abbildung 22). Die Nomenklatur wurde auch hier wie oben beschrieben für den Austausch von Nukleobasen durch TINAs als *r* für *replacement* definiert.

Die Bindung von Aptameren an Zellen wird häufig mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zu diesem Zweck muss das Oligonukleotid mit einer fluoreszierenden Gruppe markiert werden.^[122] Hier wurde eine Funktionalisierung mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) gewählt, die am 5'-Ende von C10.36 und der Punktmutante C10.36-G24A angebracht wurde. In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass das Fluoreszenz-Signal des Vollängen-Aptamers C10 in durchflusszytometrischen Messungen eine Sättigung erreichte und damit eine K_d -Bestimmung ermöglichte.^[38] Daher wurden auch die TINA-Modifikationen mit einer 6-Carboxy-Fluorescein (FAM)-Gruppe am 5'-Ende funktionalisiert. Zunächst sollte eine K_d -Bestimmung des Wildtyp-C10.36-Aptamers durchgeführt werden (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.17. Affinitätsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Ramos-Zellen mittels Durchflusszytometrie).

Die Fluoreszenzsignale sowohl von C10.36 als auch von C10.36-G24A erreichten bis zu einer Oligonukleotid-Konzentration von 10 μ M keine Sättigung. Wenn aber von einer Dissoziationsreaktion ausgegangen wird, müsste ein Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation vorliegen. Für das ungekürzte Aptamer C10 wurde von Raddatz et al. eine Dissoziationskonstante von 50 nM angegeben.^[38] Sollte die Bindung der verkürzten Version C10.36 ein Gleichgewicht dieser Größenordnung eingehen, müsste bei einer Konzentration von 5 μ M eine Sättigung eingetreten sein, was nicht der Fall war (Abbildung 23).

Mit der Durchflusszytometrie ist also die Detektion der Bindung von C10.36 an Ramos-Zellen möglich, nicht aber die Kalkulation einer Dissoziationskonstante. Um modifizierte Varianten von C10.36 zu untersuchen, wurde im Folgenden ein kompetitiver Bindungstest entwickelt. Mit diesem wurde auch ohne K_d -Bestimmung ein Vergleich der Bindungseigenschaften des Wildtyp-Aptamers mit denen der chemisch veränderten Oligonukleotide realisierbar.

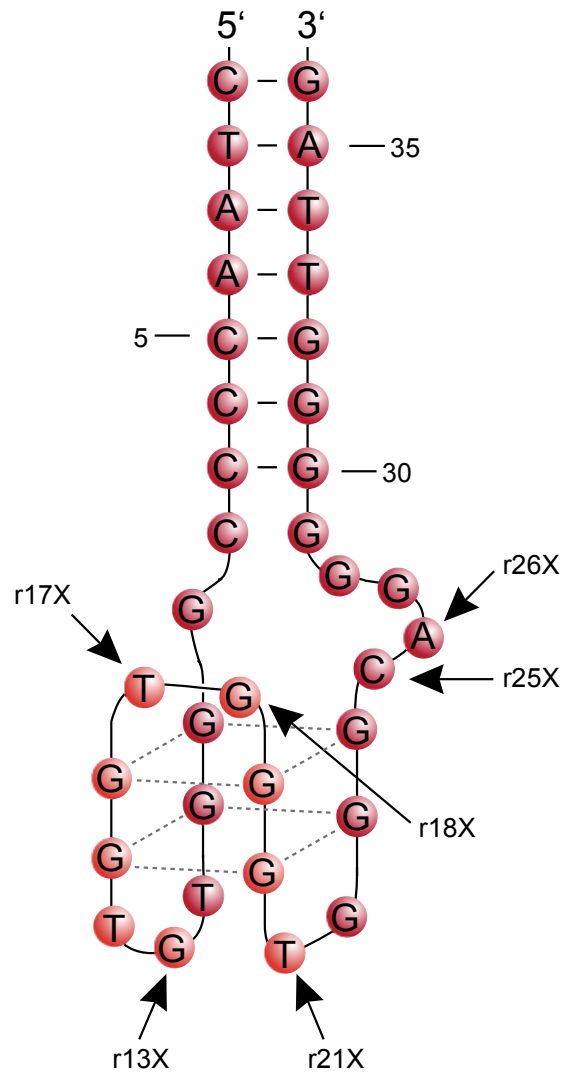


Abbildung 22. C10.36 kann, abgeleitet von seiner Sequenz, eine antiparallele G-Quadruplex-Struktur ausbilden. Strukturmodell von C10.36 mit einem zweilagigen antiparallelen G-Quadruplex von G10 bis G24. Die Positionen, an denen Nukleobasen durch TINA-Modifikationen ausgetauscht wurden, sind entsprechend markiert.

Für diesen kompetitiven Bindungstest wurden 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen der TINA-modifizierten beziehungsweise Kontroll-Aptamere mit den Zellen inkubiert. So reduzierte C10.36-FAM zum Beispiel das Fluoreszenzsignal von C10.36 mit Atto-647-Markierung, C10.36-G24A-FAM als Negativkontrolle hingegen nicht

(Abbildung 24 a, weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.17. Affinitätsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Ramos-Zellen mittels Durchflusszytometrie).

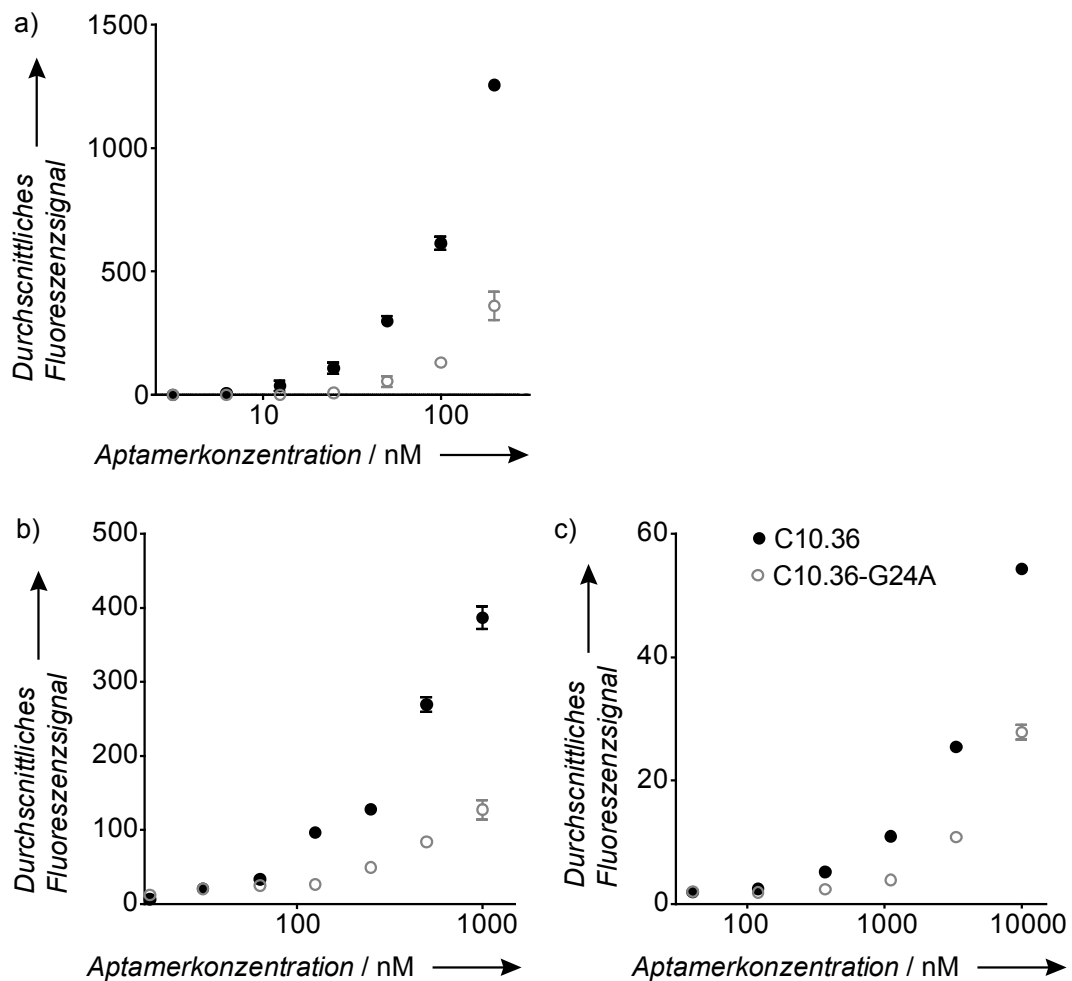


Abbildung 23. Das Signal der Inkubation von C10.36 mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer zeigte nicht den Charakter einer Sättigungsfunktion. Durchschnittsfluoreszenzwerte im Fluorescein-Kanal von Durchflusszytometer-Messungen. a) 850 V Fluorescein-Detektor-Kanal-Spannung b) 600 V Fluorescein-Detektor-Kanal-Spannung c) 350 V Fluorescein-Detektor-Kanal-Spannung. C10.36-FAM-markiert wurde mit Ramos-Zellen 30 min inkubiert und das Fluoreszenzsignal bei unterschiedlichen Laser-Spannungen gemessen. Auch bei hohen Aptamer-Konzentrationen (c) und entsprechend niedriger Detektor-Spannung und somit niedrigeren durchschnittlichen Fluoreszenzsignalen erreichte das Signal keine Sättigung.

Die Fluoreszenzwerte für C10.36-Atto-647 wurden von C10.36-r17P-FAM und C10.36-r21P-FAM nicht reduziert, hier fand keine Konkurrenz statt. Der Austausch der Nucleobasen durch die TINA-Modifikationen schien in diesen Positionen die Bindungseigenschaften zu stören. C10.36-r25P-FAM reduzierte hingegen die Affinität von C10.36-Atto-647 in ähnlichem Maße wie C10.36-FAM,

hier wurde der Austausch der Nucleobase durch die TINA-Modifikation offensichtlich toleriert.

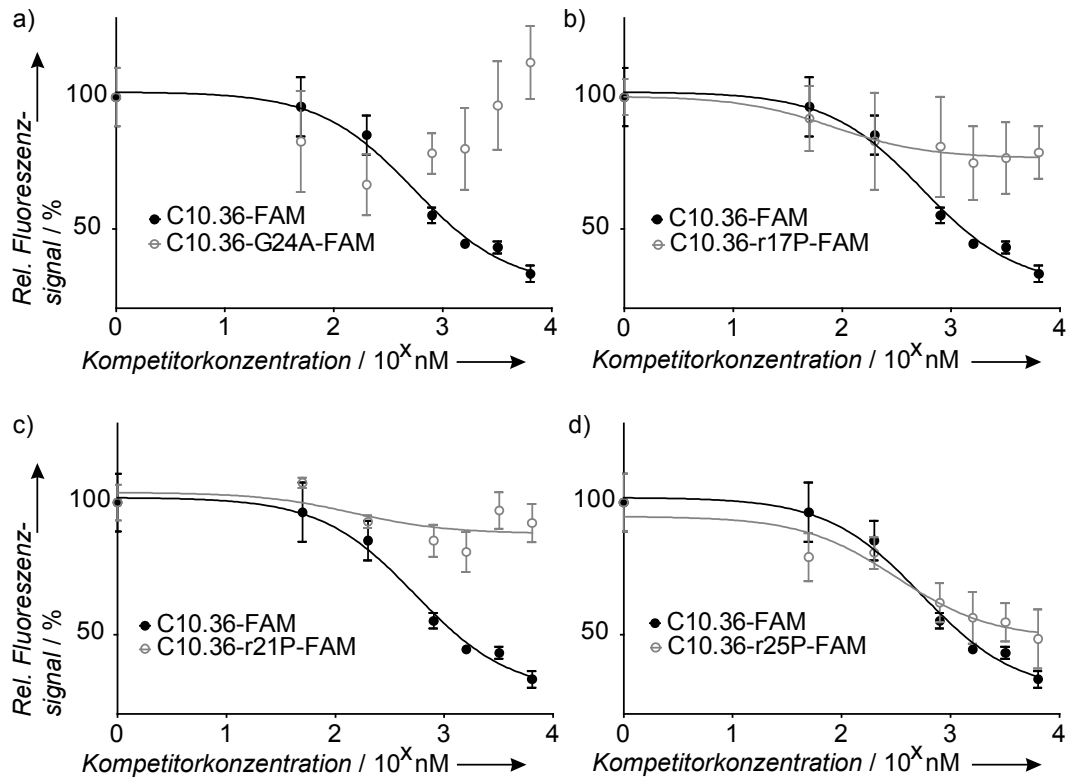


Abbildung 24. Position 25 in C10.36 tolerierte eine TINA-Modifikation.

Kompetitionsverhalten von C10.36-TINA-Modifikationen gegenüber Wildtyp-C10.36. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung nach 30 min Inkubation mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Kompetitor mit FAM-Markierung. Die Werte wurden auf das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung ohne Kompetitor normalisiert.

Es wurden weitere ersetzende C10.36-TINA Varianten, C10.36-r13P-FAM, C10.36-r18P-FAM und C10.36-r26P-FAM, getestet, die aus unbekanntem Gründen das Fluoreszenzsignal von C10.36-Atto-647 erhöhten (Anhang 9.1. C10.36-TINA zusätzliche Daten, Abbildung 44). Dieser Effekt war spezifisch, denn die C10.36-TINA-Varianten zeigten die signalverstärkende Wirkung nicht bei der Konkurrenz von C10.36-G24A-Atto-647 (Anhang 9.1. C10.36-TINA zusätzliche Daten, Abbildung 45). Da zum Zeitpunkt der Datenaufnahme allerdings nur eine Passage an Ramos-Zellen zur Verfügung stand, sollten diese Daten mit einer anderen Passage an Zellen bestätigt werden.

4.3.3.2. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie von C10.36

Für die TINA-Modifikationen C10.36-r13P, C10.36-r17P, C10.36-r18P, C10.36-r21P und C10.36-r26P wurde eine geringere Konkurrenz der C10.36-Bindung gemessen als für das Wildtyp-Aptamer. Die für die Bindung notwendige Aptamer-Struktur war in diesen Varianten wahrscheinlich gestört, weshalb nun zunächst die Struktur des Wildtyp-Aptamers untersucht werden sollte. Aufgrund der Sequenz von C10.36 wurde ein antiparalleler G-Quadruplex, ähnlich der Struktur von HD1, angenommen (Abbildung 22). Daher wurden Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie-Experimente durchgeführt, um Informationen über die Ausrichtung des G-Quadruplexes zu erhalten (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie).

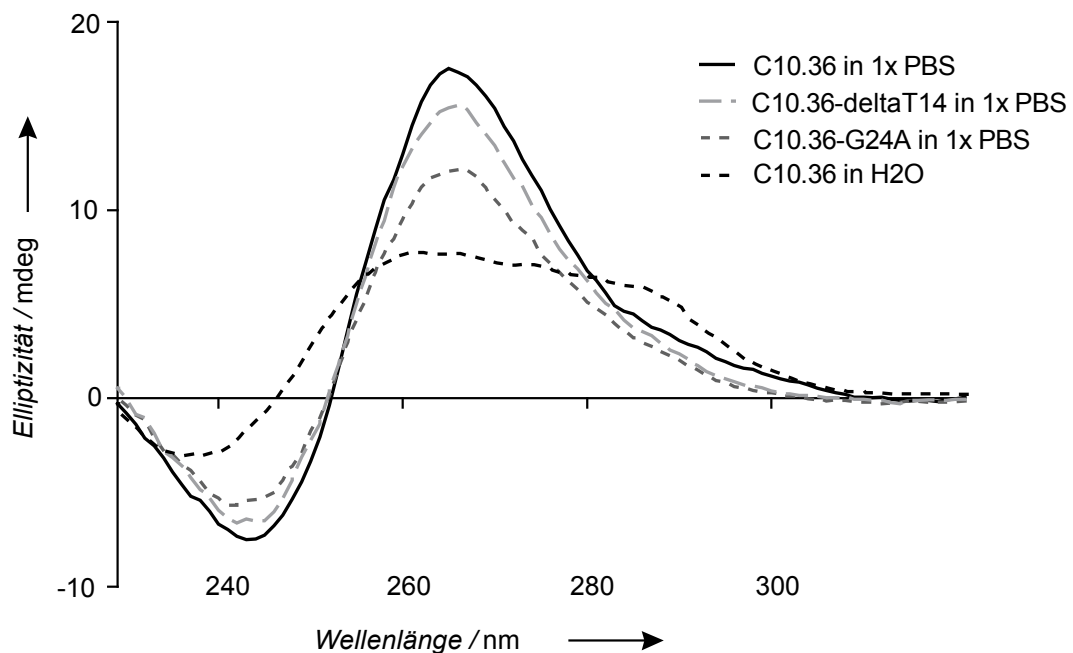


Abbildung 25. C10.36 sowie C10.36-deltaT14 bildeten einen parallelen G-Quadruplex, C10.36-G24A zeigte beeinträchtigte, aber noch vorhandene parallele G-Quadruplex-Struktur. CD-Spektren von C10.36 und Mutanten (20 μ M). Das Elliptizitäts-Maximum bei ca. 265 nm deutete auf eine parallele G-Quadruplex-Struktur hin. Sowohl die Entfernung des T an Position 14 (C10.36-deltaT14) als auch die Mutation von G nach A an Position 24 (C10.36-G34A) schien die Ausbildung des G-Quadruplexes nicht maßgeblich zu stören. Fehlten die für die G-Quadruplex-Formierung essentiellen Natrium- oder Kaliumionen, bildete sich dieser nicht aus (C10.36 in H₂O).

Wie bereits in Kapitel 3.3.3. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie von HD1-r-TINAs gezeigt, besitzt ein antiparalleler G-Quadruplex charakteristische Elliptizitäts-Maxima bei ca. 290 und 250 nm (Abbildung 16).^[117a] Ein paralleler G-Quadruplex hingegen bildet ein Maximum bei ca. 265 nm.^[120] Die CD-spektroskopischen Messungen von C10.36 zeigten ein deutliches Maximum bei ca. 265 nm (Abbildung 25, C10.36 in 1x PBS). Dies ist ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer parallelen G-Quadruplex-Struktur. Drei G-Tetraden die einen

parallelen G-Quadruplex mit einem an Position 14 aus der Struktur herausstehenden Thymin-Rest bilden wären möglich (Abbildung 26). Das Entfernen des in diesem Strukturvorschlag herausstehenden Thymidins aus der Sequenz änderte das Spektrum kaum (Abbildung 25, C10.36-deltaT14 in 1x PBS). Die Mutation des G zu A an Position 24 verringerte zwar die Intensität des Peaks bei 265 nm, nicht aber die Konstitution des Spektrums (Abbildung 25, 10.36-G24A in 1x PBS). Dies legt nahe, dass die Mutation die Ausbildung einer der drei G-Tetraden verhindert, die anderen beiden aber noch den G-Quadruplex bilden konnten. Wenn die für die G-Quadruplex-Formierung essentiellen Natrium- oder Kaliumionen^[56] nicht in der Oligonukleotid-Lösung vorhanden waren, wurde das charakteristische Spektrum nicht beobachtet. Demnach trat keine G-Quadruplex-Bildung auf (Abbildung 25, C10.36 in H₂O).

4.3.3.3. Bindung von C10.36-TINAs II

Die CD-spektroskopischen Daten (Abbildung 25) wiesen auf einen parallelen G-Quadruplex in der C10.36 Struktur hin (Abbildung 26). In Studien unserer Kooperationspartner um Erik B. Pedersen wurden Hinweise gefunden, dass neben antiparallelen auch parallele G-Quadruplexe durch verdrehte interkalierende Nukleinsäure stabilisiert werden konnten.^[81]

Deshalb synthetisierte Jesper Wengel von der Abteilung Physik, Chemie und Pharmazie der University of Southern Denmark weitere C10.36-Varianten mit in die Sequenz eingeschobene und Nukleobasen ersetzende TINAs an oder in der Nähe von Position 25 (Abbildung 26). Da im Kompetitions-Test keine Fluoreszenzmarkierung des Analyten notwendig war, trugen diese Varianten keine FAM-Markierung. Die Nomenklatur für in die Sequenz eingeschobene TINAs wurde auch hier, wie oben beschrieben, mit i für *insertion* gewählt.

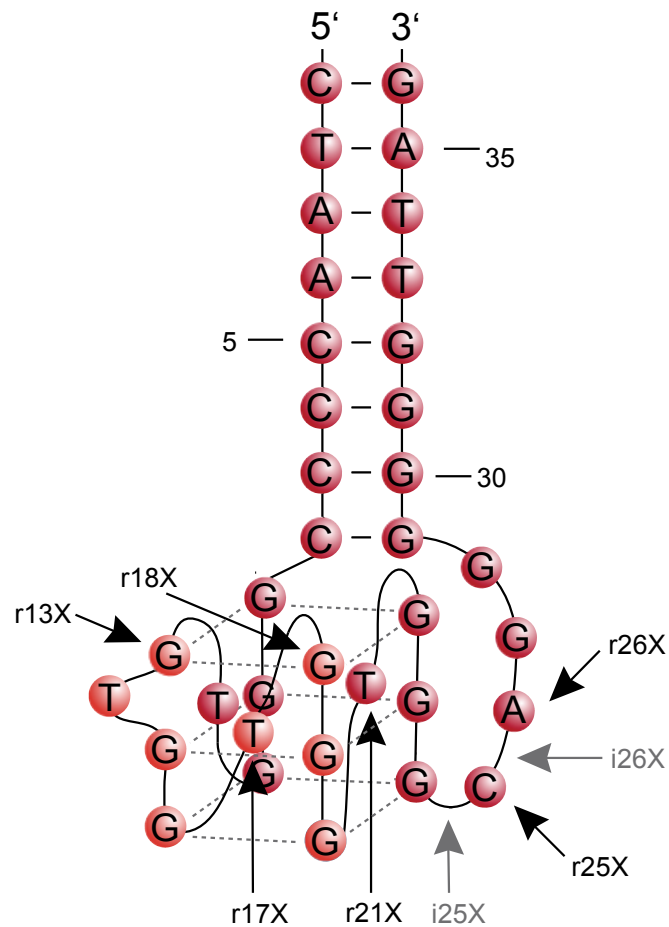


Abbildung 26. C10.36 kann, abgeleitet aus den Daten der CD-Spektroskopie, eine parallele G-Quadruplex-Struktur ausbilden. Strukturmodell von C10.36 als ein dreilagiger paralleler G-Quadruplex von G9 bis G24 mit einem ausgebeulten T14. Die Positionen, an denen Nucleobasen durch TINA-Modifikationen ausgetauscht wurden, sind entsprechend markiert.

Die modifizierten Varianten wurden mit dem Kompetitions-Test untersucht. Es wurde deutlich, dass die TINA-Gruppen um Position 25 zwar die Bindungseigenschaften kaum verschlechterten, aber auch nicht verbesserten (Abbildung 27). Alle Modifikationen zeigten geringfügig reduzierte Competition der Bindungseigenschaften im Vergleich zu dem Wildtyp-Aptamer.

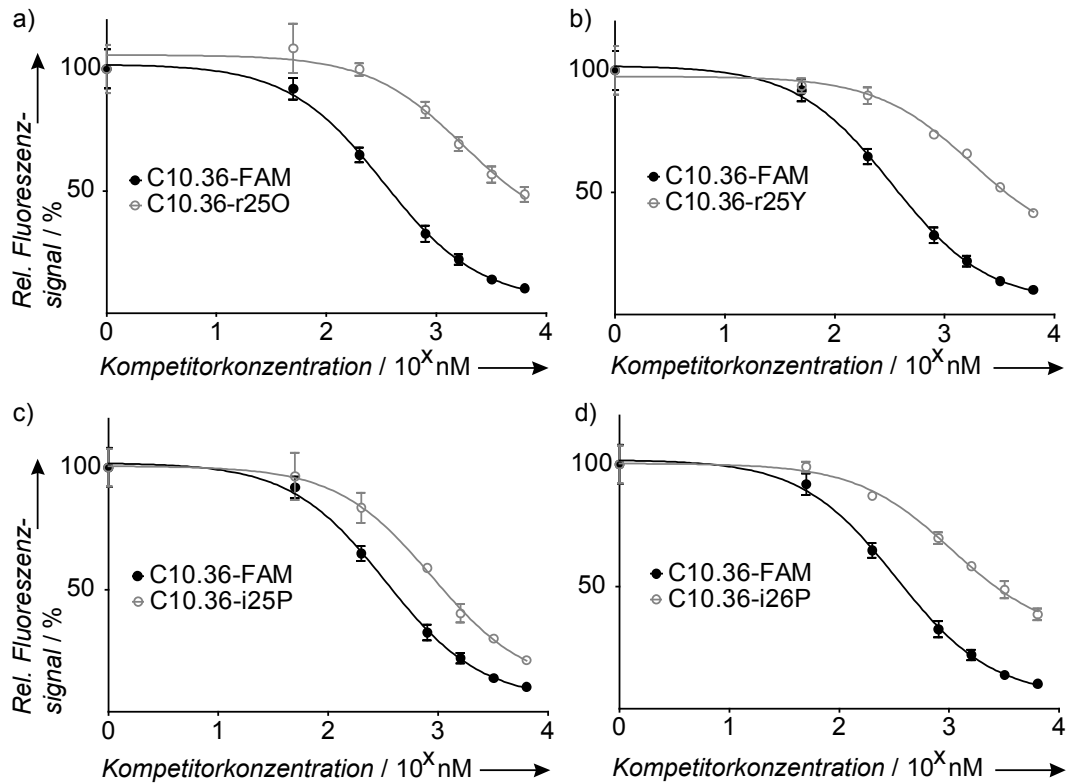


Abbildung 27. C10.36 mit para-TINA(P)-Modifikation an Position 25 zeigte vergleichbare Wettbewerbseigenschaften wie Wildtyp-C10.36. Wettbewerbsverhalten von C10.36-TINA-Modifikationen gegenüber Wildtyp-C10.36. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung nach 30 min Inkubation mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Kompetitor mit und ohne FAM-Markierung. Die Werte wurden auf das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung ohne Kompetitor normalisiert.

4.4. LNS

Nicht nur verdrehte interkalierende Nukleinsäuren, eine Veränderung von sowohl Base als auch Zucker, sondern auch *Locked* Nukleinsäuren (LNS) können die räumliche Anordnung der Nukleobasen festigen, die thermische Stabilität erhöhen und damit die Bindungseigenschaften von Aptameren verbessern.^[75, 123] Bei LNS wurde in die Ribose eine zusätzliche Methylen-Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff eingebaut. Diese Verbrückung hält den Zuckerring in der C3'-endo Konformation.^[124] Es wird unterschieden zwischen I-LNS und dem Diastereoisomer alpha-L-LNS (Abbildung 28).^[125]

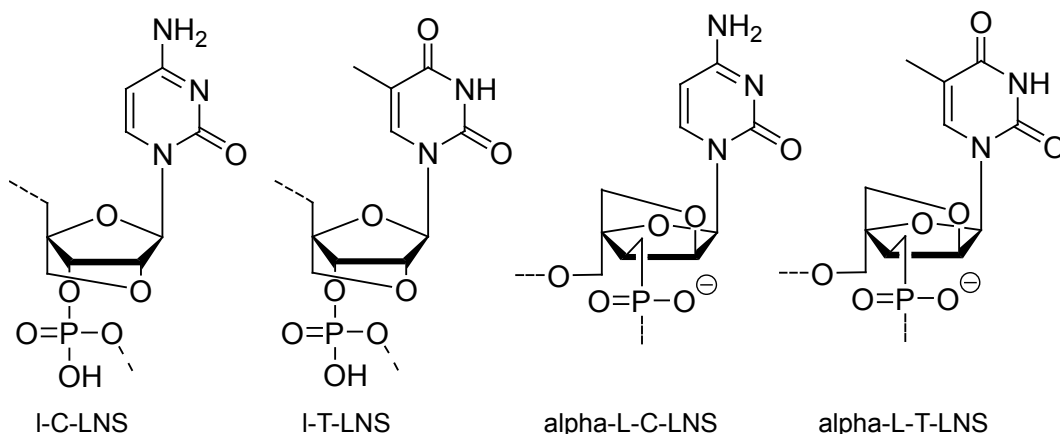


Abbildung 28. Die LNS Modifikationen. *Locked* Nukleinsäuren (LNS) besitzen eine zusätzliche Brücke in der Ribose und stabilisieren damit deren Konformation.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Modifikation mit LNS die Interaktion eines Aptamers gegen seine Ziel-Sequenz auf dem TAR-Element von HIV verstärkt.^[79] Dieser Effekt kam durch eine erhöhte thermische Stabilität des Duplexes aus TAR-Element und LNS-modifiziertem Aptamer zustande. Diese Veränderung der thermischen Stabilität kann auch bei der LNS-Modifikation des Ramos-zellspezifischen Aptamers TD05 beobachtet werden. Dort führt die Einführung von LNS-Gruppen in die Stammschleife des Aptamers zu einer gesteigerten Nuklease-Resistenz.^[77] Bei einem Avidin-bindenden Aptamer, welches allerdings keine Stammschleifen-Struktur besitzt, konnte die Einführung einer LNS-Modifikation eine 8,5-fache Anhebung der Bindung bewirken.^[76]

4.4.1. Bindung von HD22-LNS

Die erhöhte thermische Stabilität von LNS-Modifikationen wird hauptsächlich durch verbesserte Hybridisierungseigenschaften im Nukleinsäure-Doppelstrang erreicht.^[126] HD22 weist in seiner Sequenz eine Region von Base 1 bis 4 und 26 bis 29 auf, welche die Möglichkeit zur Ausbildung einer Stammschleife besitzt. Wenn dieser Doppelstrang eine höhere Stabilität erreichen würde, könnte dies möglicherweise die Gesamtstruktur des Aptamers festigen und damit die Interaktionsfähigkeit des Oligonukleotids mit seinem Zielprotein intensivieren. Aus diesem Grund synthetisierte unser Kooperationspartner Jesper Wengel von der Abteilung Physik, Chemie und Pharmazie der University of Southern Denmark HD22-Varianten mit LNS-Modifikationen an Position 3 beziehungsweise 28. Diese wurden auf ihre Bindungseigenschaften an Thrombin im Filterretentionstest untersucht (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest). In einem ersten Test von HD22-r3alphaT, -r3IT, -r28alphaC und -r28IC zeigte HD22-r28alphaC eine geringere Affinität als unmodifiziertes HD22 (Anhang 9.2. HD22 LNS zusätzliche Daten, Abbildung 46), deshalb wurde es in den hier gezeigten Bindungsstudien nicht weiter untersucht.

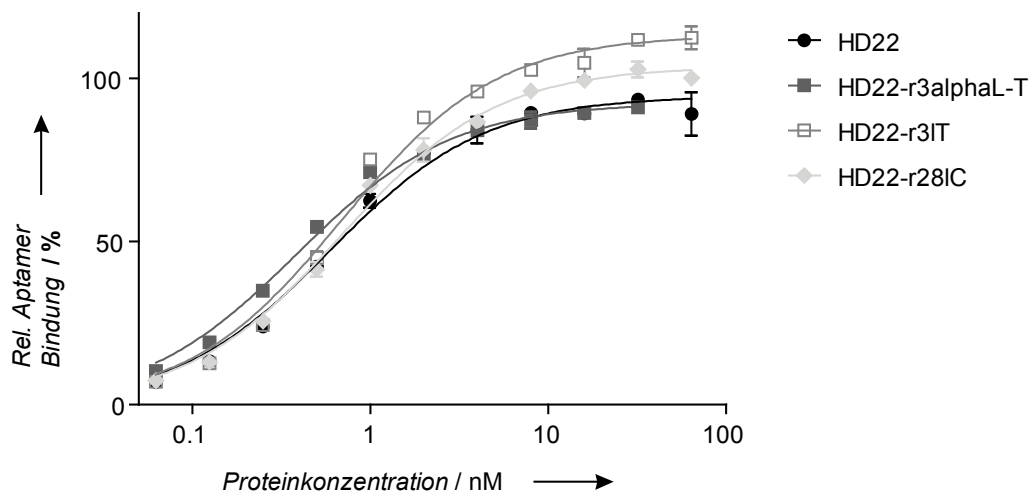


Abbildung 29. Die LNS Modifikationen HD22-r3alphaT, HD22-r3IT und HD22-r28IC beeinflussten die Affinität zu Thrombin nur geringfügig. Bindung von HD22 und HD22-LNS-Modifikationen im Filterretentionstest mit Thrombin-Konzentrationen von 0,0625 bis 64 nM.

Die anderen Varianten verhielten sich im Bindungstest sehr ähnlich wie das Wildtyp-Aptamer (Abbildung 29). Es konnte keine Verschlechterung, aber auch keine signifikante Verbesserung der Affinität zu Thrombin durch die eingesetzten LNS erreicht werden.

4.5. Lichtsensible Modifikationen

4.5.1. Azo-HD1

Das anti-Thrombin-Aptamer HD1 besteht aus 15 Nukleotiden, die einen G-Quadruplex bilden. Dessen Konformation bringt die Basen T3 und T12 in die entsprechende Stellung, um mit der Exosite I von Thrombin interagieren zu können (Abbildung 2).^[119] Durch die Modifikation von Nukleobasen in HD1 oder einer entsprechenden antisense-Verlängerung mit photo-labilen Schutzgruppen konnte die amidolytische Aktivität von Thrombin entweder ein- oder ausgeschaltet werden (Abbildung 4). Allerdings wurde HD1 nur entweder aktiviert oder inaktiviert. Wenn die photo-labile Schutzgruppe einmal abgespalten war, konnte das Aptamer nicht wieder in seinen Ursprungszustand zurück gebracht werden.^[83, 87a] Diese Möglichkeit zum Ein-, aber auch wieder Ausschalten der Aptamer-Aktivität sollte nun durch die Einführung des lichtabhängigen molekularen Schalters Azobenzol erfolgen.

In der Einleitung wurde die lichtinduzierte räumliche Strukturänderung der Azobenzol-Gruppe bereits erläutert (siehe 2.3 Chemische Modifikationen von Aptameren). In dem hier im Folgenden vorgestellten Ansatz soll Azobenzol nicht nur als Ersatz einer Base verwendet, sondern direkt im Zucker-Phosphat-Rückgrat verbaut werden. Dort könnte die Azobenzol-Gruppe, eingeführt in die Schleife von Position 7 bis 9 in HD1, die Strukturausbildung des Aptamers lichtabhängig kontrollieren. In der *trans*-Anordnung des Azobenzols sollten die Nukleobasen räumlich so weit voneinander entfernt sein, dass keine Interaktion der Gs untereinander stattfinden kann. In der *cis*-Anordnung dagegen wäre die Formierung des G-Quadruplexes und damit theoretisch auch die für die Affinität zu Thrombin verantwortliche Ausrichtung der übrigen Nukleobasen möglich. Um diese Hypothese zu untersuchen, synthetisierten unsere Kooperationspartner um Alexander Heckel vom Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt eine Azobenzol-modifizierte Variante von HD1, Azo-HD1 (Anhang 9.3. Struktur Azo-HD1, Abbildung 47). In deren Sequenz wurden die Basen von Position 7 bis 9 durch die Azobenzol-Verbindung ersetzt. Das Aptamer wurde auf seine Affinität zu Thrombin in den unterschiedlichen Konformationen im Filterretentionstest untersucht (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest).

Als Belichtungsquelle wurde eine UVP 3UV Lampe mit einer Belichtungszeit von 5 min in einem Abstand von 10 cm gewählt. Da die UV-Lampe keine völlig gleichmäßige Verteilung der Strahlung gewährleisten konnte, wurde in einem eigenständigen Experiment in einem UV-Bestrahlungsgerät (Spezifikationen siehe 8.3. Geräte) 5 min bestrahlt. Azo-HD1 zeigte vor Belichtung eine reduzierte Bindung zu Thrombin (Abbildung 30, Azo-HD1-*trans*). Dies schien die Vermutung zu bestätigen, dass in der *trans*-Anordnung des Azobenzols die Struktur von HD1 gestört war und es damit nicht an Thrombin binden konnte.

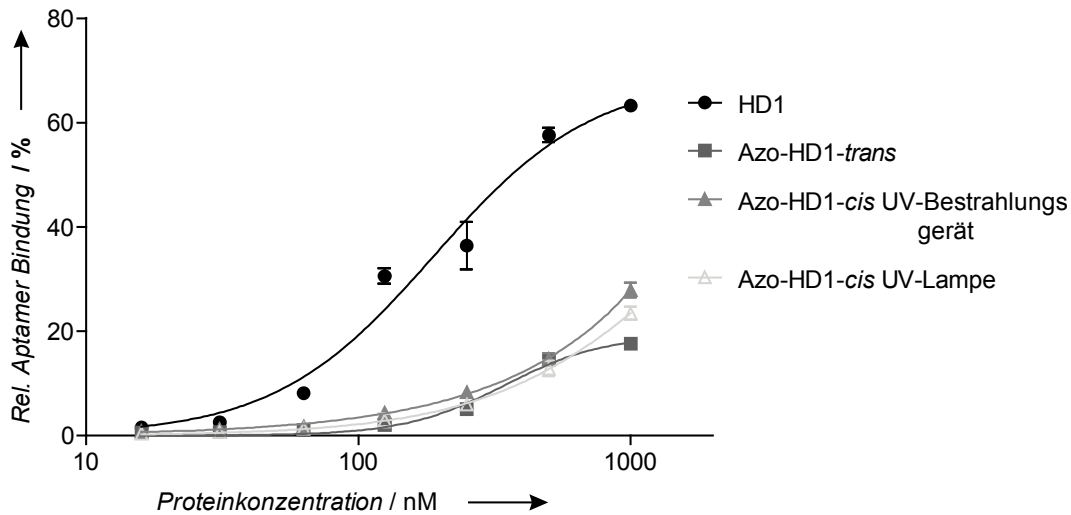


Abbildung 30. Azo-HD1 erreichte nach Beleuchtung mit UV-Licht $\lambda = 365$ nm nicht die Affinität von HD1 zu Thrombin. Bindung von HD1 und Azo-HD1 unbelichtet und belichtet mit verschiedenen UV-Quellen im Filterretentionstest an Thrombin in Konzentrationen von 16 bis 1000 nM. Keine Belichtungsform resultierte in einer hinreichenden Affinitätssteigerung.

Nach Bestrahlung mit der UV-Lampe beziehungsweise dem UV-Bestrahlungsgerät konnte allerdings nur eine marginale Änderung in den Bindungseigenschaften festgestellt werden. Das Aptamer besaß auch in der *cis*-Form des Azobenzols eine stark verringerte Affinität zu Thrombin (Abbildung 30, Azo-HD1-*cis*). Die *cis*-Anordnung schien das Aptamer nicht vollständig in seine bindende Konformation zu bringen.

4.5.2. Aptamer-basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES)

Ziel dieser Arbeit war unter anderem, mit der chemischen Modifikation der photo-labilen Gruppen die Grenzen des lichtabhängigen Schützens und Entschützens einzelner Positionen in Proteinen zu überschreiten. Komplette regulatorische Epitope sollten lichtschaltbar gemacht werden. Dafür sollte das Aptamer HD1, funktionalisiert mit einem photo-spaltbaren Verknüpfers, das Epitop Exosite I, welche die Fibrinogen-Bindung an Thrombin vermittelt, binden und blockieren. Der photo-spaltbare Verknüpfers, funktionalisiert mit einer *cross-link*-Gruppe, würde eine Bindung mit Lysinresten des Proteins eingehen. Dadurch könnte das Aptamer einen kovalenten Komplex mit Thrombin bilden. Die lichtgesteuerte Spaltung des Verknüpfers gäbe das Epitop wieder frei und würde die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin (ein essentieller Schritt in der Gerinnungskaskade, siehe 2.4.1 Die Gerinnungskaskade) ermöglichen. So würde das funktionalisierte Aptamer zu einer effizienten Schutzgruppe der Interaktionsfläche Exosite I aufgewertet. Dies würde eine verlässliche, aber temporäre Maskierung dieser regulatorischen Proteinoberfläche bedeuten.

Das Oligonukleotid hat eine Interaktionsfläche von ca. 915 \AA^2 (Daten aus PDB-Datei:1PPB), während eine klassische Nitrophenylethyl (NPE)-Schutzgruppe eine Oberfläche von nur 110 \AA^2 abdeckt. Dies verdeutlicht die potentielle Überlegenheit der im Folgenden vorgestellten Aptamer-basierten Epitop-Schutzgruppen (ABES) in der reversiblen Interaktionsflächen-Inhibition gegenüber einzelnen photo-labilen Schutzgruppen. Vor diesem Hintergrund synthetisierten unsere Kooperationspartner um Alexander Heckel vom Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt, unter Verwendung eines DNS-Bausteins nach Ordoukhanian und Taylor^[127], eine funktionalisierte Version von HD1, genannt fHD1, mit einer photo-spaltbaren Erweiterung am 3'-Ende, gefolgt von einer terminalen Aminogruppe (Abbildung 31 a).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Modifikation von HD1 am 3'-Ende und nicht am 5'-Ende erfolgen musste, da bei letzterem die Aktivität des Aptamers drastisch reduziert wurde.^[87b] In einem ersten Reaktionsschritt der Herstellung der ABES wurde eine Funktionalisierung von fHD1 mit Sulfo-[Ethylen Glycolbis(Succinimidylsuccinat)] (sulfo-EGS, Abbildung 31 a), das zwei sulfo-NHS-Gruppen beinhaltet, durchgeführt. Dies sollte zu einem Aptamer-basiertem Reagenz (Abbildung 31 b) führen, das nach der Bindung an Exosite I von Thrombin einen kovalenten Komplex mit einer der benachbarten Lysingruppen des Proteins bilden würde.

Diese photo-labile Verknüpfung wäre essentiell. In einem nicht-kovalenten Komplex aus Aptamer und Thrombin würde aktive Protease freigesetzt, sobald die lokale Konzentration in die Nähe der Dissoziationskonstante von $\approx 100 \text{ nM}$ käme oder diese unterschreiten würde (Abbildung 33 a). Mit der kovalenten Verknüpfung wäre die Exosite I blockiert, Fibrinogen könnte nicht mehr binden und die Gerinnungsaktivität des Moleküls wäre auch bei niedrigen Konzentrationen inhibiert.

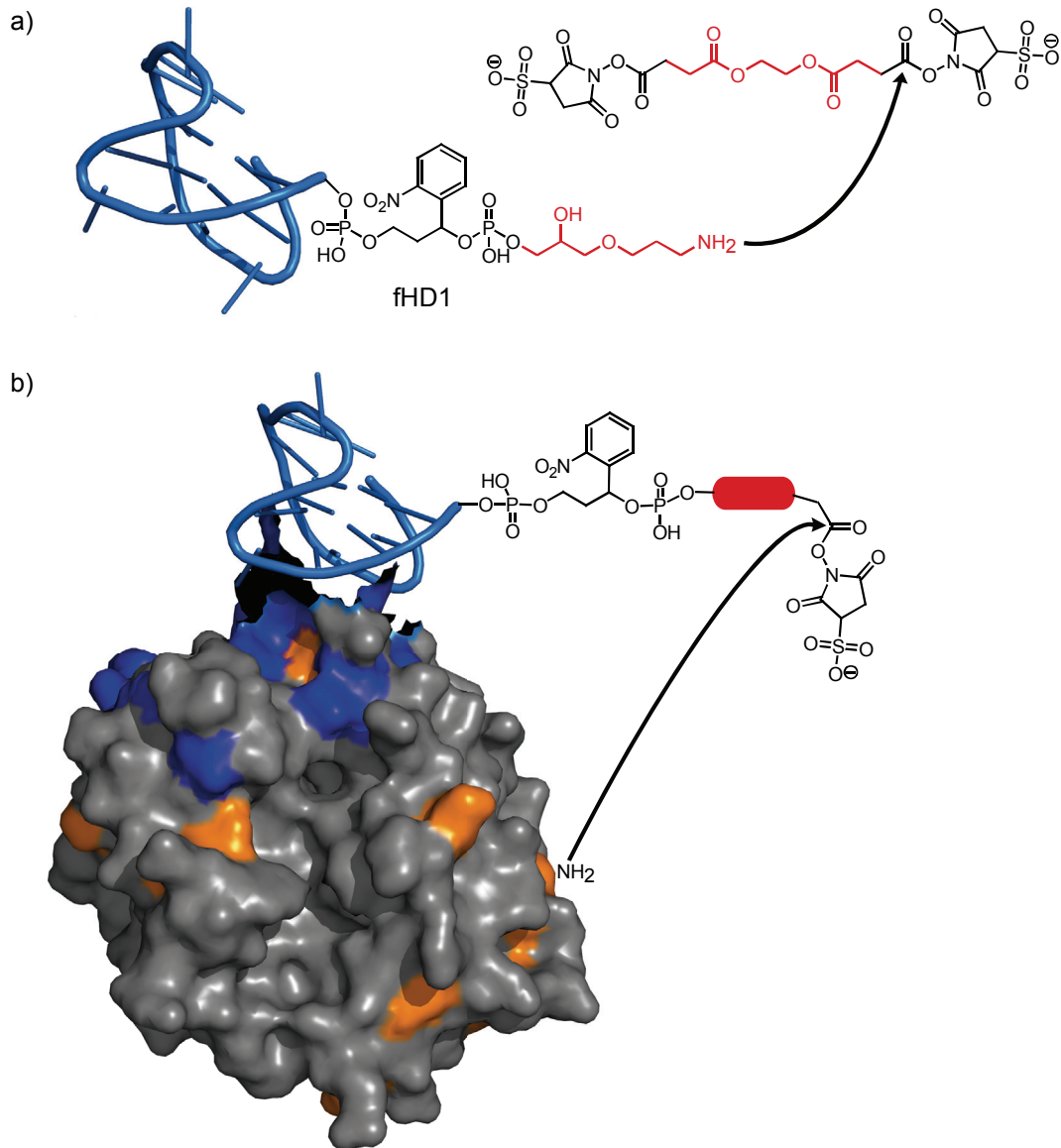


Abbildung 31. Herstellung des Komplexes aus Aptamer basierter Epitop-Schutzgruppe (ABES) und Thrombin. a) fHD1 samt photo-spaltbarer Verlängerung und 3'-terminaler Amino-Modifikation reagiert mit sulfo-EGS, dadurch entsteht ein Molekül mit Aptamer-Element und einer photo-spaltbaren sulfo-NHS-Ester-Gruppe. b) Das Aptamer-Element des Moleküls bindet an Exosite I von Thrombin und ermöglicht den *cross-link* von einer zufälligen Lysin-Gruppe mit dem sulfo-NHS-Ester. PDB-Datei: 4DII (Exosite I ist blau markiert, die Lysin-Gruppen sind in orange dargestellt).

Durch Bestrahlung des kovalenten Komplexes aus Aptamer und Protein mit UV-Licht sollte der Verknüpferspalter gespalten werden (Abbildung 32). Das Aptamer wäre dann nicht mehr kovalent mit dem Protein verbunden und würde von dem Protein dissoziieren. Übrig bliebe ein Thrombin-Molekül mit dem Verknüpferspalter-Rest an einem Lysin. Dieses Enzym sollte nun, nachdem die Exosite I wieder freigegeben wäre, amidolytisch aktiv sein, Fibrinogen zu Fibrin schneiden und damit die Gerinnung im Plasma forcieren.

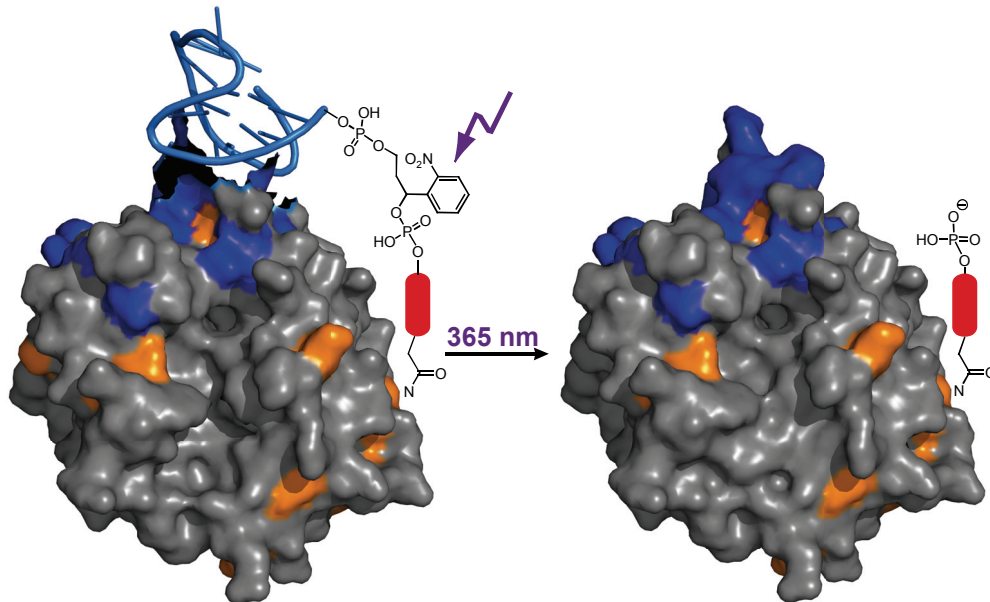


Abbildung 32. Photo-Spaltung des Komplexes aus Aptamer basierter Epitop-Schutzgruppe und Thrombin. Thrombin im kovalenten Komplex mit fHD1 wird bestrahlt ($\lambda = 365 \text{ nm}$), daraufhin wird der photo-sensible Verknüpferspalter gespalten und fHD1 kann aufgrund seiner relativ niedrigen Affinität ($K_d \approx 100 \text{ nM}$) die Fibrinogenbindestelle Exosite I freigegeben. Die Gerinnungsaktivität von Thrombin ist damit wieder hergestellt. PDB-Datei: 4DII (Exosite I ist blau markiert, die Lysin-Gruppen sind in orange dargestellt).

4.5.2.1. Bindung von fHD1 und fHD1-T4A

Um den kovalenten Komplex mit Thrombin ausbilden zu können, musste das funktionalisierte Aptamer weiterhin Affinität zu dem Zielprotein besitzen. Aus diesem Grund wurden Filterretentionstests von fHD1, der Punktmutante fHD1-T4A sowie aus Vergleichsgründen den unfunktionalisierten Aptameren HD1 und HD1-T4A durchgeführt (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.4. Filterretentionstest).

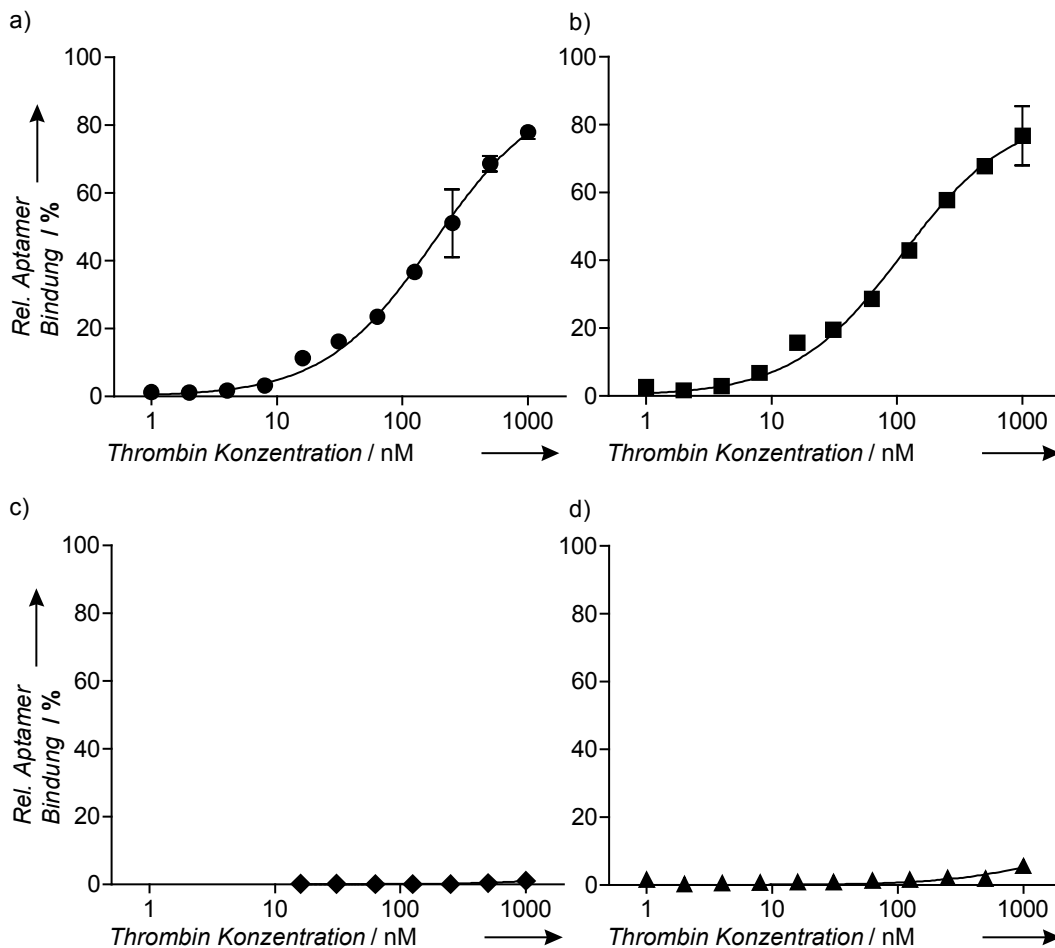


Abbildung 33. HD1 und fHD1 hatten eine vergleichbare Affinität zu Thrombin, die Punktmutanten HD1-T4A und fHD1-T4A zeigten bis 1000 nM keine Bindung an Thrombin. Bindung von a) HD1, b) fHD1, c) HD1-T4A und d) fHD1-T4A im Filterretentionstest an Thrombin in Konzentrationen von 1 bis 1000 nM.

Die Untersuchungen ergaben, dass die fHD1-Modifikation keinen Einfluss auf die Affinität des Aptamers zu Thrombin (Abbildung 33 a und b) hatte. Die Punktmutante HD1-T4A zeigte bis zu einer Konzentration von 1000 nM keine Bindung zu Thrombin, die funktionalisierte Version fHD1-T4A ließ ähnliche Bindungseigenschaften erkennen (Abbildung 33 c und d). fHD1 war also für den Einsatz als ABES geeignet.

4.5.2.2. Western Blot cross-link

Die oben postulierte Ausbildung des kovalenten Komplexes zwischen fHD1 und Thrombin wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gefolgt von einer Western Blot Analyse, visuell nachgewiesen. Als Kontrollexperimente wurden die Reaktionen einmal mit der Punktmutante des Aptamers mit reduzierter Affinität zu Thrombin, HD1-T4A, des Weiteren ohne EGS-Verknüpfers und schließlich ohne jedwedem Aptamer durchgeführt (weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.9. Ausbildung des Komplexes aus ABES und Thrombin und 7.13. Western Blot).

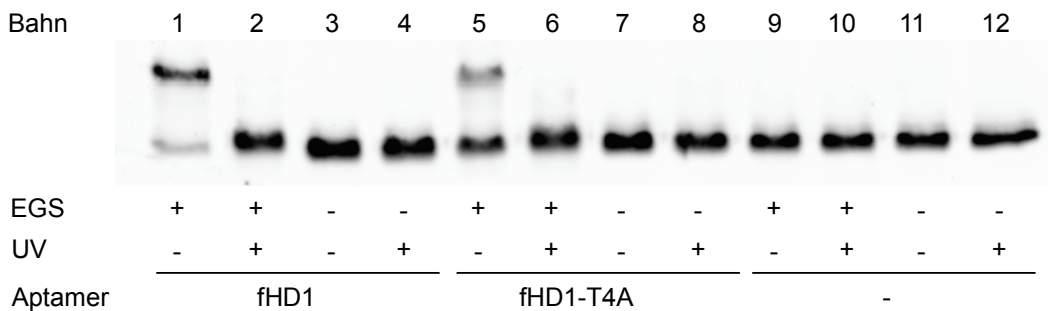


Abbildung 34. fHD1, funktionalisiert mit sulfo-EGS, bildete einen kovalenten Komplex mit der schweren Seitenkette von Thrombin. Die Punktmutante fHD1-T4A, funktionalisiert mit sulfo-EGS, reagierte ebenfalls mit Thrombin, aber in geringerem Ausmaß. Western Blot von *cross-link* Proben nach denaturierendem SDS-PAGE Gel. Es wurden fHD1 (Bahnen 1-4), fHD1-T4A (Bahnen 5-8) oder kein Aptamer (Bahnen 9-12) für den *cross-link* eingesetzt. Sulfo-EGS-Verknüpfers und Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) mit einem UV-LED Gerät wurden wie angegeben eingesetzt.

Die leichte (6 kDa) und schwere Kette (31,5 kDa) von Thrombin sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, welche durch die reduzierenden und denaturierenden Bedingungen im SDS-PAGE Gel gespalten wurde. Der *cross-link* aus Aptamer (5,5 kDa) und der schweren Kette von Thrombin resultierte in einer Bande bei 37 kDa. Wie in Abbildung 29 gezeigt, brachte die Reaktion einen Aptamer-Thrombin Komplex (Abbildung 34, Bahn 1) hervor, welcher mittels der Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) gespalten werden konnte (Abbildung 34, Bahn 2). Wurde die Punktmutante fHD1-T4A in die Reaktion eingesetzt, war ebenfalls ein kovalenter Komplex zu erkennen (Abbildung 34, Bahn 5), aber in deutlich schwächerer Ausprägung. Die Bandenintensität wurde quantifiziert und ist in Abbildung 41 im Anhang dargestellt. Der fHD1-T4A Komplex war gleichermaßen lichtspaltbar (Abbildung 34, Bahn 6). Bei Verzicht entweder auf das Aptamer oder den sulfo-EGS-Verknüpfers war keine Bandenverschiebung zu beobachten (Abbildung 34, Bahnen 3,4 und 7-12). Mittels dieser Western Blot Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass fHD1 einen *cross-link* mit Thrombin eingeht.

4.5.2.3. Kompetitive Aptamere im cross-link

Aus den oben gezeigten Western Blot Resultaten wurde ersichtlich, dass nicht nur fHD1, sondern auch die Punktmutante fHD1-T4A unter den Bedingungen des *cross-links* einen kovalenten Komplex mit Thrombin ausbildet. Bei den eingesetzten Konzentrationen von über 100 μM Aptamer im Reaktionsgemisch waren unspezifische Wechselwirkungen von fHD1-T4A mit Thrombin nicht ausgeschlossen.^[101] Zusätzlich zeigten aktuelle Studien, dass unfunktionalisiertes HD1 nicht nur an Exosite I bindet, sondern auch eine schwache Interaktion mit der basischen Exosite II von Thrombin aufbaut. Die Exosite II von Thrombin besteht aus vielen basischen Aminosäureresten, daher wäre dort eine Interaktion mit negativ geladenen DNS-Aptameren möglich.^[128] Die hier präsentierten Western Blot Ergebnisse erbrachten neue Erkenntnisse zu diesen beiden Phänomenen.

Die Ausbildung des Komplexes von sowohl fHD1 als auch fHD1-T4A mit Thrombin resultierte in einer dominanten Bande, entsprechend dem 1:1-Komplex, und einer zusätzlichen, langsamer wandernden Bande. Diese stellte höchstwahrscheinlich den ternären Komplex aus zwei fHD1- (Abbildung 35, Bahn 2) beziehungsweise fHD1-T4A-Molekülen (Abbildung 36, Bahn 2), kovalent an Thrombin gebunden, dar. Obere und untere Bande des fHD1 und fHD1-T4A *cross-links* waren nach Bestrahlung nicht mehr zu erkennen (Abbildung 35 beziehungsweise 36, Bahn 3). Durch die Zugabe von Kompetitor-Aptameren sollte nun geklärt werden, an welches Epitop von Thrombin fHD1 und fHD1-T4A binden. Für fHD1 waren weder die Zugabe von equimolaren Konzentrationen von nicht modifiziertem HD1, noch die Zugabe von HD1-T4A ausreichend, die Ausbildung des ternären Komplexes von fHD1 mit Exosite I und II zu verhindern (Abbildung 35, Bahnen 4 bis 9). Die Zugabe von HD22, ein Aptamer, welches Exosite II spezifisch erkennt,^[61] hingegen reduzierte eindeutig die Ausbildung des ternären Komplexes (Abbildung 35, Bahn 10 und 12).

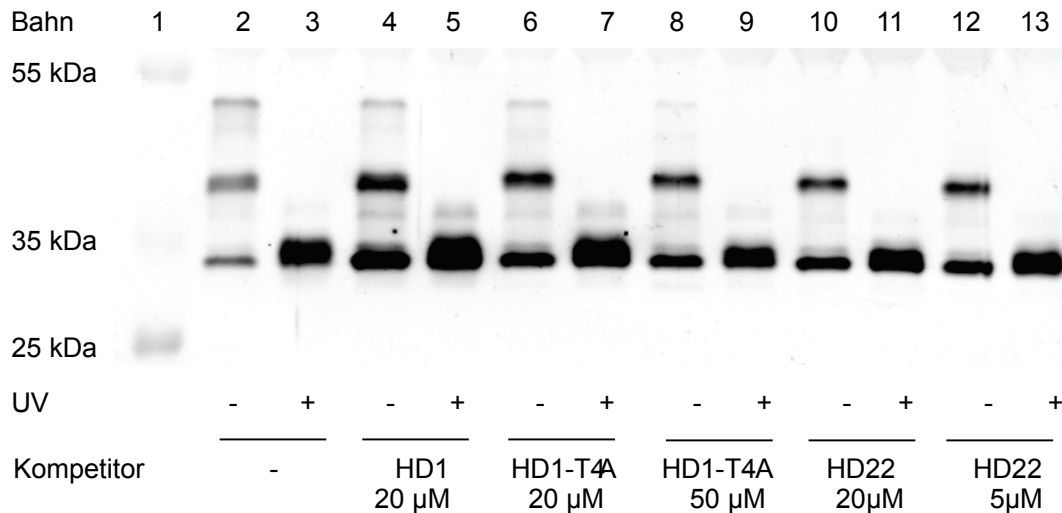


Abbildung 35. fHD1 bildete Komplexe mit Exosite I und Exosite II. Eine Konkurrenz um die Bindungsstelle konkurrierenden Aptameren konnte die Komplexbildung steuern. Western Blot von fHD1 *cross-link* Proben nach denaturierendem SDS-PAGE Gel. Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) mit dem UV-LED Gerät und Kompetitor-Aptamere wurden wie angegeben eingesetzt. In Bahn 1 war zum Größenvergleich eine PageRuler Plus Prestained Protein Leiter aufgetragen. Die schwere Kette von Thrombin hatte eine Masse von 31,5 kDa, fHD1 von 5,5 kDa. Der kovalente Komplex aus der schweren Kette von Thrombin plus ein Aptamer lief also auf einer Höhe von ca. 37 kDa, zwei Aptamere kovalent mit der schweren Kette verbunden hatten eine Masse von ca. 42,5 kDa. Die Konkurrenz mit HD1 und HD1-T4A unterband kaum die Bildung eines kovalenten Komplexes mit zwei fHD1 Aptameren (obere Bande), während die Konkurrenz mit dem Exosite II-bindenden Aptamer HD22 nur noch den Komplex mit einem fHD1 Aptamer entstehen ließ. fHD1 band also nicht nur an Exosite I, sondern auch an Exosite II, dies konnte aber mit HD22 Konkurrenz unterbunden werden.

Bei dem Einsatz des Kontroll-Aptamers fHD1-T4A in den *cross-link*-Experimenten war auch für dieses Aptamer eine Bande auf Höhe des Komplexes aus Aptamer und Thrombin zu erkennen (Abbildung 36, Bahn 5). Der ternäre Komplex mit Exosite I und II war hingegen nur schwach ausgebildet (Abbildung 36, Bahn 2 obere Bande) und wurde durch die Konkurrenz mit HD1 eliminiert (Abbildung 36, Bahn 4). Der 1:1-Komplex konnte nicht durch die Zugabe von HD1 oder HD1-T4A verhindert werden. Wenn allerdings mit HD22 kompetitiert wurde, war kein ternärer Komplex und auch nur noch sehr wenig Signal für ein Aptamer verbunden mit Thrombin zu erkennen (Abbildung 36, Bahnen 10 und 12). HD22 schien also die Bindung von fHD1-T4A an Exosite II zu blockieren.

Ergebnisse

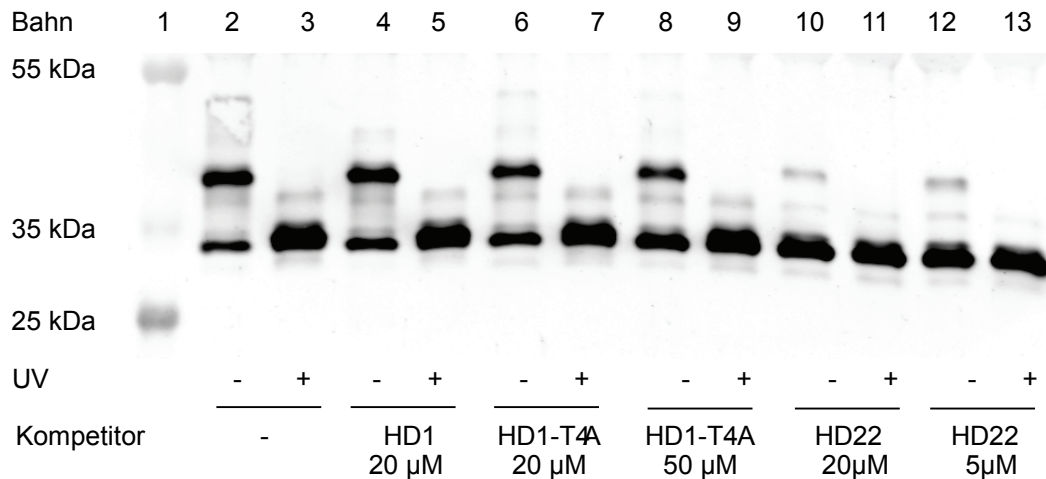


Abbildung 36. fHD1-T4A bildete hauptsächlich einen Komplex mit Exosite II. Eine Konkurrenz um die Bindungsstelle konkurrierenden Aptameren konnte die Komplexbildung steuern. Western Blot von fHD1-T4A *cross-link* Proben nach denaturierendem SDS-PAGE Gel. Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) mit dem UV-LED Gerät und Kompetitor-Aptamere wurden wie angegeben eingesetzt. In Bahn 1 wurde zum Größenvergleich eine PageRuler Plus Prestained Protein Leiter aufgetragen. Die schwere Kette von Thrombin hatte eine Masse von 31,5 kDa, fHD1-T4A von 5,5 kDa. Der kovalente Komplex aus der schweren Kette von Thrombin plus ein Aptamer lief also auf einer Höhe von ca. 37 kDa, zwei Aptamere kovalent mit der schweren Kette verbunden hatten eine Masse von ca. 42,5 kDa. Die Konkurrenz mit HD1-T4A unterband nicht die Formierung eines kovalenten Komplexes mit zwei fHD1 Aptameren (obere Bande), während die Konkurrenz mit HD1 nur noch den Komplex mit einem fHD1-T4A Aptamer entstehen ließ. Konkurrenz mit HD22 führte zu einer fast vollständigen Inhibition des *cross-links*. fHD1-T4A band also hauptsächlich Exosite II.

Aus diesen Daten resultierte, dass fHD1 zwar Affinität zu Exosite I und Exosite II hatte, aber hauptsächlich Exosite I bindet, während fHD1-T4A fast ausschließlich Exosite II erkennt.

4.5.2.4. Bead-Aufreinigung des *cross-links*

In den oben gezeigten Western Blot Experimenten war zu erkennen, dass nach Ausbildung des *cross-links* immer eine gewisse Restmenge an nicht funktionalisiertem Thrombin in der Lösung verblieb (Abbildung 37, Bahn 1 untere Bande). Dieses Rest-Thrombin könnte, vorausgesetzt es ist enzymatisch aktiv, den Gerinnungsprozess bereits vor der Bestrahlung auslösen und damit das Ziel, ein lichtabhängiges Koagulationssystem zu erreichen, torpedieren. Daher wurde die weitere Abreicherung dieses freien Thrombins mittels eines *bead*-Aufreinigungs-Ansatzes untersucht. Es wurden magnetische *beads*, gekoppelt mit 3'-biotinyliertem HD1 (HD1-bio), das mit dem freien Thrombin in der Lösung interagieren sollte, mit dem Reaktionsprodukt inkubiert.

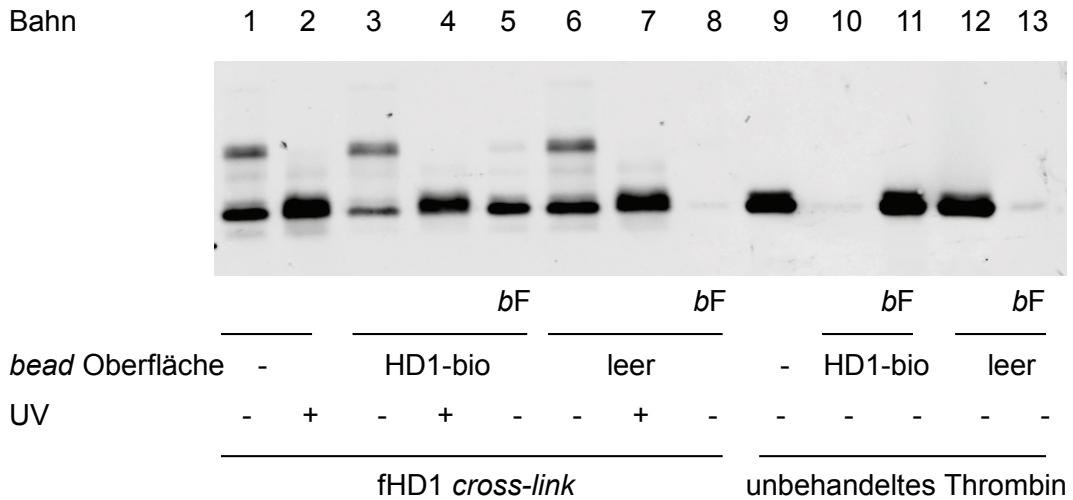


Abbildung 37. Thrombin in der Reaktionslösung, das keinen *cross-link* mit fHD1 bildete, konnte nicht mit HD1-bio beschichteten *beads* aus der Reaktionslösung entfernt werden. Western Blot von *cross-link* Proben mit fHD1 an Thrombin (Bahn 1 bis 8) und Thrombin ohne Funktionalisierung (Bahn 9 bis 13) nach denaturierendem SDS-PAGE Gel vor und nach Aufreinigung durch *beads* beschichtet mit und ohne HD1-bio. *bF* kennzeichnet die *bead*-Fraktion, hier wurde das Thrombin, welches nach der Aufreinigung auf den *beads* verblieb, aufgetragen. Die unteren Banden zeigen Thrombin (schwere Kette) mit 31,5 kDa, die oberen Banden haben eine Höhe von ca. 37 kDa, also ein Aptamer zusammen mit Thrombin (schwere Kette). Die untere Bande in Bahn 3, Thrombin ohne Aptamer aus der Reaktionslösung nach der Aufreinigung durch *beads* mit HD1-bio Oberfläche, ließ sich nicht durch HD1-bio aus der Reaktionslösung entfernen, während in Bahn 10 unbehandeltes Thrombin vollständig an den HD1-bio *beads* gebunden war.

Der Komplex aus Aptamer basierter Epitop-Schutzgruppe und Thrombin ohne *bead*-Aufreinigung wurde in Abbildung 37, Bahnen 1 und 2 aufgetragen, die HD1-bio Aufreinigung in Abbildung 37, Bahnen 3 bis 5. Es war zu erkennen, dass die HD1-bio *beads* die Menge Thrombin, welche nicht kovalent mit fHD1 funktionalisiert war, reduziert, aber nicht vollständig eliminiert. In Abbildung 37 Bahn 6 bis 8 ist die Aufreinigung des Komplexes mit nicht funktionalisierten *beads* aufgetragen. Diese waren nicht in der Lage, Thrombin aus der Reaktionslösung zu entfernen. Thrombin ohne Funktionalisierung (Abbildung 37, Bahn 9) wurde mit HD1-bio aufgereinigt (Abbildung 37, Bahn 10) und vollständig mit den *beads* aus der Lösung abgetrennt (Abbildung 37, Bahn 11). Dies war mit den nicht funktionalisierten *beads* nicht möglich (Abbildung 37, Bahnen 12 und 13). Das in der unteren Bande von Bahn 3 erkennbare Thrombin war also im Gegensatz zu dem freien Thrombin in Bahn 10 nicht durch die HD1-bio-funktionalisierten *beads* aufzureinigen. Die Bindung von HD1-bio und damit auch von fHD1 an Thrombin schien für diese Moleküle gestört zu sein. Daraus ließ sich schließen, dass diese Restmenge an Thrombin im Koagulationsprozess inaktiv war.

4.5.2.5. Hirudin-Test

Um die erfolgreiche Maskierung der Exosite I in dem kovalenten Komplex zu untersuchen, wurde ein amidolytisches Testsystem in An- und Abwesenheit von Hirudin angewandt. Hirudin erkennt gleichzeitig Exosite I und das aktive Zentrum von Thrombin mit einer sehr hohen Affinität (K_d -Wert von 0,2 pM) und blockiert dadurch die amidolytische Aktivität (Abbildung 38 a).^[106] Der kovalente Komplex sollte einen Teil der enzymatischen Aktivität bewahren, da er die Bindung von Hirudin inhibiert (Abbildung 38 b). Bestrahlung befreit Thrombin von der Exosite I-Maskierung, Hirudin könnte binden, was eine vollständige Inhibition der Peptidspaltung zur Folge hätte (Abbildung 38 c).

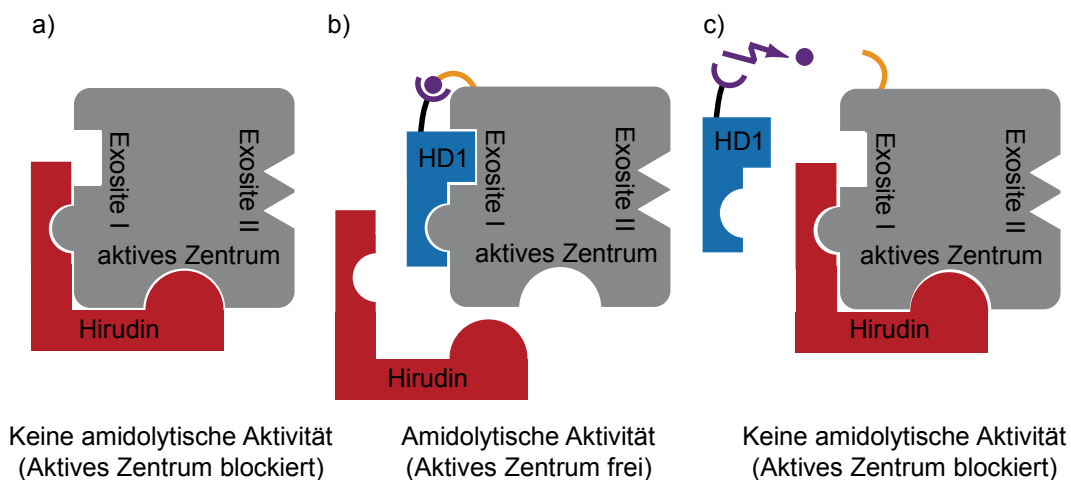


Abbildung 38. Der Hirudin-Test untersuchte die Blockierung der Exosite I im ABES-cross-link. a) Hirudin bindet Exosite I und gleichzeitig das aktive Zentrum von Thrombin. Damit wäre die amidolytische Aktivität inhibiert. b) Nachdem der kovalente Komplex aus fHD1 und Thrombin gebildet wurde, könnte Hirudin nicht an die Exosite I binden, Thrombin würde amidolytische Aktivität zeigen. c) Nach Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) wäre die kovalente Bindung gespalten, Hirudin sollte aufgrund seiner hohen Affinität das Aptamer verdrängen können und die amidolytische Aktivität inhibieren.

Diese Vorgänge konnten durch die experimentellen Daten bestätigt werden (für Angaben zur Durchführung siehe 7.10. Amidolytische Aktivität von Thrombin). Ohne Aptamer wurde die amidolytische Aktivität von Thrombin durch die Zugabe von Hirudin vollständig inhibiert (Abbildung 39, schwarze Balken). Der *cross-link* von Thrombin und fHD1 zeigte ohne Hirudin volle amidolytische Aktivität, die sich zwar durch die Beigabe von Hirudin verringerte, aber erst durch die UV-Bestrahlung blockiert wurde (Abbildung 39, dunkelgraue Balken). Dies wies eindeutig auf die Maskierung der Exosite I durch das Aptamer hin.

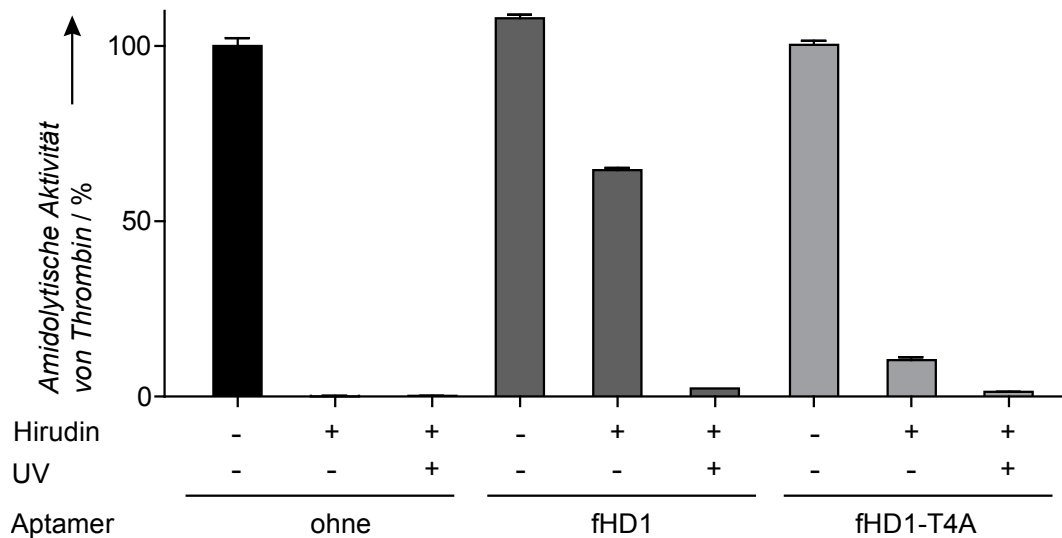


Abbildung 39. Der fHD1 *cross-link* verhinderte die Hirudin-abhängige Inhibition der amidolytischen Aktivität von Thrombin. Dargestellt ist die Änderung der amidolytischen Aktivität von 7 nM fHD1-ABES von Thrombin, gemessen durch das Fluoreszenzsignal des fluorogenen Peptid-Substrats I-1140, in Relation zur Kinetik der amidolytischen Aktivität von 7 nM Thrombin ohne fHD1, Hirudin oder Bestrahlung (erster schwarzer Balken). Ohne Aptamer (schwarze Balken) wurde durch die Zugabe von 15 nM Hirudin die amidolytische Aktivität komplett inhibiert. Durch die ABES auf Basis von fHD1 blieb ein Teil der amidolytischen Aktivität trotz Hirudinzugabe erhalten, welche durch Bestrahlung mit dem UV-LED Gerät ($\lambda = 365$ nm) inaktiviert wurde (dunkelgraue Balken). Bei der ABES auf Basis von fHD1-T4A war der Anteil an erhaltener amidolytischer Aktivität deutlich geringer (hellgraue Balken).

Kontrollexperimente mit fHD1-T4A, das, wie in den Konkurrenzexperimenten gezeigt, nur in geringem Maße an Exosite I bindet (siehe Abbildung 36), offenbarte kaum lichtabhängige Inhibition der amidolytischen Aktivität von Thrombin. Erhöhte Hirudin-Konzentrationen reduzierten die amidolytische Aktivität des kovalenten Komplexes (siehe 9.4.2. Hirudin-Test zusätzliche Daten, Abbildung 49). Dies ist möglicherweise durch eine Konkurrenz von fHD1 durch Hirudin, welches, verglichen mit HD1, eine 500.000fach höhere Affinität zu Thrombin hat, aus dem Komplex oder durch eine Rest-Interaktion von Hirudin mit dem aktiven Zentrum selbst in Anwesenheit von fHD1 begründet. Der Hirudin-Test verdeutlichte den spezifischen *cross-link* von fHD1 an die Exosite I und dessen Fähigkeit, die Bindung anderer Proteine an dieses Epitop zu verhindern.

4.5.2.6. Plasma-Gerinnungstest

Nachdem oben verdeutlicht wurde, dass fHD1 die Exosite I erkennt und einen kovalenten Komplex eingeht, der die Bindung von anderen Proteinen an dieses Epitop verhindert, war die biologische Aktivität in der Gerinnungskaskade von großem Interesse. Dafür wurde ein sensitives spektrometrisches Testsystem eingesetzt, das die erhöhte Absorption von UV-Licht der Plasma-Gerinnung nutzte. Der fHD1-Thrombin Komplex wurde vor und nach Bestrahlung in humanes pool-Plasma gegeben und die Adsorption gemessen (für weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.11. Plasma-Gerinnungstest). Das schwache UV-Licht des Plattenlesers des Testsystems war nicht ausreichend für die Spaltung der photo-labilen Verknüpfung.^[129]

Wenn die Fibrinogen-Bindestelle durch den kovalenten Komplex zwischen fHD1 und Thrombin maskiert war, verursachte dessen Zugabe keine Koagulation des Plasmas (Abbildung 40 a). Bestrahlung ($\lambda = 365 \text{ nm}$) hatte die Freigabe von Thrombin zur Folge, was zu einer Gerinnungsbildung führte (Abbildung 40 b), veranschaulicht durch die Absorptionserhöhung. Im Gegensatz dazu war bei der Reaktion mit fHD1-T4A kein signifikanter Unterschied zwischen der Gerinnungsaktivität vor und nach Bestrahlung erkennbar (Abbildung 40 c, d). Gleiches gilt für die Kontrollreaktion ohne Oligonukleotid und ohne sulfo-EGS-Verknüpfers (Abbildung 40 e, f). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Western Blot Analysen wird die Gerinnungsbildung auch in Proben ohne Aptamer oder ohne Verknüpfers nicht inhibiert (siehe 9.4.3. Gerinnungstest zusätzliche Daten, Abbildung 51). In den Experimenten zur Aufreinigung der Reaktionsgemische (4.5.2.4. *Bead*-Aufreinigung des *cross-links*) wurde die Hypothese aufgestellt, dass das in dem Reaktionsgemisch verbleibende, nicht funktionalisierte Thrombin mit seiner Exosite I nicht mehr mit HD1 interagieren konnte. Eine Strukturveränderung der Exosite I hätte auch den Verlust der Bindungseigenschaften für Fibrinogen zur Folge. Dies wurde durch die Gerinnungsaktivität in Abbildung 40 a bestätigt. Würde die Exosite I des nicht-funktionalisierten Thrombin in dieser Probe mit Fibrinogen interagieren, würde letzteres zu Fibrin gespalten und es wäre Gerinnungsaktivität zu beobachten. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Thrombin, das nicht im Komplex mit fHD1 steht, nicht in der Lage ist, Fibrinogen zu binden.

Zusammenfassend verdeutlichten diese Daten, dass der kovalente Komplex zwischen Thrombin und fHD1 die Exosite I maskierte und dass dieses Epitop durch Bestrahlung reaktiviert wurde.

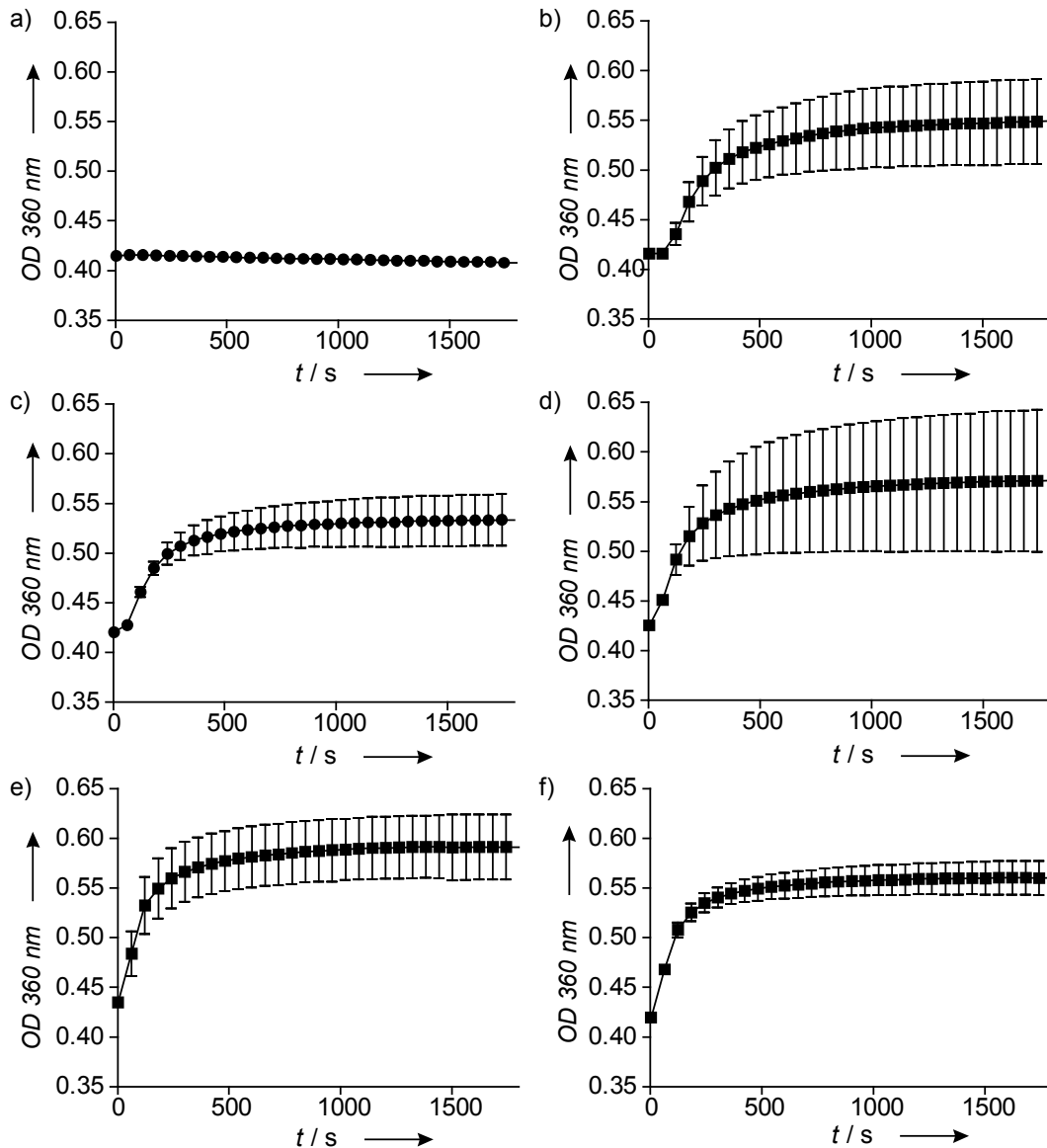
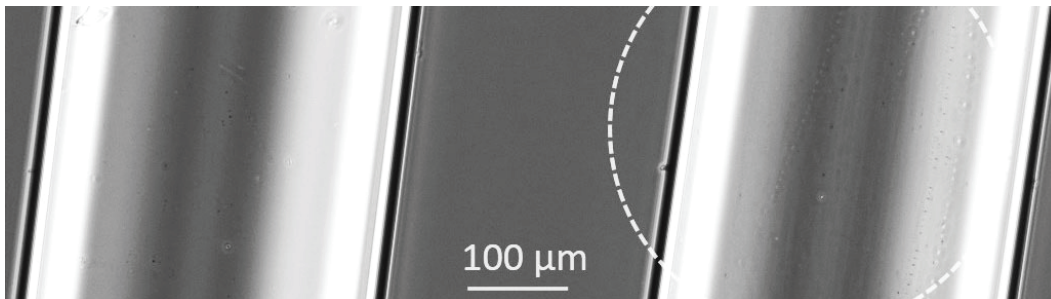


Abbildung 40. Thrombin mit fHD1-ABES zeigte eine vollständige Gerinnungsinhibition. Die Gerinnungsaktivität konnte durch Spaltung der photo-labilen Schutzgruppe wieder hergestellt werden. Plasma-Gerinnungstest mit fHD1-Thrombin Komplex vor und nach dreiminütiger UV-Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) mittels des UV-LED-Gerätes. Ein Fibrin-Gerinnsel führte zu einer erhöhten Absorption bei 360 nm. a) Thrombin mit fHD1-ABES vor UV-Bestrahlung b) Thrombin mit fHD1-ABES nach UV-Bestrahlung c) Thrombin mit fHD1-T4A-ABES vor UV-Bestrahlung d) Thrombin mit fHD1-T4A-ABES nach UV-Bestrahlung e) Thrombin, welches den *cross-link* Prozess ohne Aptamer durchlief, vor UV-Bestrahlung f) Thrombin, welches den *cross-link* Prozess ohne Aptamer durchlief, nach UV-Bestrahlung.

4.5.2.7. Fibrillenbildung in Glaskapillaren

Die oben gezeigten Daten ließen bereits darauf schließen, dass das ABES-System aus Thrombin und fHD1 effektiv funktionierte. In einem finalen Experiment sollte nun die lichtgesteuerte Freigabe von Thrombin und die darauffolgende Gerinnselbildung visualisiert werden. Dazu wurde eine Fibrinogen-Lösung zusammen mit dem kovalenten Komplex in zwei Glaskapillaren inkubiert. Eine davon wurde in einem kleinen Bereich mit UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) bestrahlt, während die andere unbestrahlt blieb. Die Gerinnselbildung wurde durch Lichtmikroskopie in Zusammenarbeit mit Manuela Fichte, Florian Schäfer und Alexander Heckel vom Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt aufgezeichnet. Für weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.15. Mikroskopie von Fibrillenbildung.

a)



b)

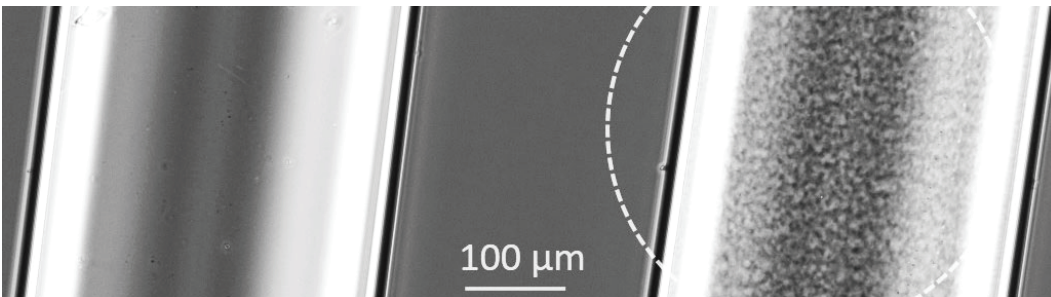


Abbildung 41. Mittels der fHD1-ABES an Thrombin konnte ein Fibrin-Gerinnsel orts- und zeitaufgelöst in einer Glaskapillare dargestellt werden. Mikroskopiebilder der Fibrin-Gerinnselbildung in Glaskapillaren vor (a) und 28 min nach (b) UV-Bestrahlung der rechten Kapillare mit einer UV-Hg Lampe, Bestrahlungszeit 1 min ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Beide Kapillaren wurden mit 8 mg/ml Fibrinogen und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Thrombin-fHD1-Komplex befüllt. Die rechte Kapillare wurde innerhalb des weiß gestrichelten Bereichs bestrahlt.

Vor der Bestrahlung befand sich in beiden Kapillaren flüssige Fibrinogen-Lösung (Abbildung 41 a). Nachdem die rechte Kapillare innerhalb des weiß gestrichelten Bereichs bestrahlt wurde, bildete sich innerhalb von 28 min Messzeit ein Fibrin-Gerinnsel. In der unbestrahlten Kapillare hingegen fand keine Veränderung statt (Abbildung 41 b). Dieses Experiment wurde in einem Video festgehalten, welches unter <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201306686/supinfo> und auf

der der Arbeit beigefügten CD abgerufen werden kann.^[130] Hiermit konnte die lichtinduzierte Freigabe der Fibrinogen-Bindestelle und darauffolgende Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität des Komplexes von Thrombin visualisiert werden.

5. Diskussion

Diese Dissertation hatte zum Ziel, die Werkzeugkiste der Chemischen Biologie um Anwendungen, die auf chemisch modifizierten Aptameren basieren, zu erweitern. Der Kostendruck in der Diagnostik, aber auch in der molekularbiologischen Forschung macht neue, effiziente Systeme zur Biomarker-Analytik und Kontrolle von biologischen Prozessen notwendig. Aptamere sind im Vergleich zu etablierten, häufig auf Antikörpern basierenden Methoden, durch die einfache Herstellung per Festphasensynthese oftmals kostengünstiger und einfacher zu verwenden. Der Einsatz von Aptameren ist für viele Anwendungen vor Allem durch deren chemische Modifikation möglich. Die sich nun anschließende Diskussion der Ergebnisse verdeutlicht, warum chemisch modifizierte Aptamere in Zukunft häufiger in den „Werkzeugkisten“ chemisch-biologischer Labore zu finden sein werden.

5.1. Apta-Sensoren

Aptamere wurden bereits häufig zur Konstruktion von analytischen Systemen, sogenannten Apta-Sensoren, verwendet. In der klinischen Routineanalytik haben sich auf Aptameren basierende Systeme bisher allerdings nicht durchgesetzt.^[25] Viele der Apta-Sensoren sind an große, immobile Detektionsapparaturen gebunden, die eine direkte Messung von Umwelt- oder Patientenproben vor Ort schwierig machen.^[18] Eine Lösung dieses Problems könnten die in dieser Arbeit vorgestellten Siebdruck-Elektroden-Sensoren sein, die mit den auf den Elektroden durchgeführten Impedanz-Messungen eine mobile und flexible Messung des Analyten ermöglichen.

Die Quantifizierung des Proteins Lysozym durch einen Apta-Sensor mit Siebdruck-Elektrode wurde erstmals durch Erdem et al. beschrieben.^[28] Für die dortige Messung war allerdings zunächst eine Inkubation der Probe mit magnetischen *beads*, beschichtet mit dem Lysozym-Aptamer, nötig. Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Apta-Sensor konnte der Analyt hingegen direkt auf der Elektrode quantifiziert werden (Abbildung 7). Die mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren erhöhten die Oberfläche der Elektrode und senkten durch die auf diese Weise gesteigerte lokale Konzentration des Aptamers das Detektionslimit. Das mit einer 5'-Amino-Gruppe modifizierte Lysozym-Aptamer (APT) zeigte im Vergleich zu den nicht verwandten Proteinen ERK2 und Thrombin eine deutlich höhere Affinität zum Zielprotein (Abbildung 8 a-c). Die randomisierte Kontroll-DNS ließ deutlich weniger Bindung zu Lysozym und keine Affinität zu ERK2 und Thrombin erkennen (Abbildung 8 d-f). Es konnte davon ausgegangen werden, dass das APT-Aptamer den Analyten Lysozym spezifisch bindet. Dadurch gelang diesem Sensor die erfolgreiche Quantifizierung des Modell-Proteins Lysozym.^[111] Die Mobilität des Messsystems des Apta-Sensors

auf Basis der Siebdruck-Elektrode kann von großem Vorteil für Anwendungen in der klinischen Diagnostik oder der Analyse von Umweltproben sein.

Eine große Herausforderung für einen Apta-Sensor ist nicht nur die Quantifizierung der Stoffmenge, sondern auch die Bestimmung der katalytischen Aktivität eines Enzyms. Im Vorfeld dieser Dissertation existierte kein verlässliches Testsystem für die Messung der enzymatischen Aktivität der Gerinnungsproteine Thrombin und APC.^[20-21] Diese katalysieren die Spaltung von Proteinen, die bei der Blutgerinnung wichtige Rollen spielen. Die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von Thrombin und APC gelang durch das Oligonukleotid-basierte Ergreifen von Enzymen (*oligonucleotide-based enzyme capture assay*, OECA). Dieser Ansatz ebnete den Weg zur schnellen und verlässlichen Quantifizierung dieser Proteine aus Patientenproben (Abbildung 9). Da die eingesetzten Aptamere HD1-22 und HS02-52G am 3'-Ende mit Biotin chemisch modifiziert worden waren, musste sichergestellt werden, dass die Modifizierung keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften hatte. Auch in Gegenwart der Inhibitoren Argatroban, einer kleinen organischen Verbindung, beziehungsweise Aprotinin, einem Peptid, sollten sie ihre Zielproteine binden.

Die Biotinylierung von HD1-22 verringerte das Interaktionssignal des Aptamers von ca. 30 % auf ca. 15 % der maximal möglichen Bindung. Die Bindung wurde jedoch durch die Anwesenheit des Thrombin-Inhibitors Argatroban nicht weiter beeinflusst (Abbildung 10 a). Für HS02-52G hingegen war die Bindung an APC ohne Aprotinin (ca. 5 % für HS02-52G und ca. 10 % für HS02-52G-bio) recht gering, stieg aber mit höheren Konzentrationen des Inhibitors an (Abbildung 10 b). In Bindungsstudien der APC- beziehungsweise Thrombin-bindenden Aptamere HS02-52G und HD1-22 an Aprotinin ohne Zielmolekül war diese Korrelation zwischen Bindungssignal und Peptid-Inhibitor-Konzentration ebenfalls zu erkennen (Abbildung 11). Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Steigerung des Signals für den Bindungstest von APC mit steigenden Konzentrationen von Aprotinin nicht auf eine allosterische Bindung, sondern auf eine unspezifische Wechselwirkung des Aptamers mit Aprotinin zurückzuführen war. Da die Bindung von HS02-52G an APC in Gegenwart des Peptid-Inhibitors höher war als die Bindung von HS02-52G an Aprotinin alleine, war von einer Assoziation des Aptamers an APC in Gegenwart von Aprotinin auszugehen. HS02-52G bindet APC also auch in Gegenwart von Aprotinin. Der Einsatz des Peptid-Inhibitors hatte aber den Nachteil, die potentiellen Bindungsplätze auf der Sensor-Oberfläche durch unspezifische Wechselwirkungen zu blockieren. Da HS02-52G aber eine hohe Affinität von 0,5 nM^[65] zu APC besitzt, war davon auszugehen, dass das Enzym den Peptid-Inhibitor von der Aptamer-beschichteten Oberfläche verdrängt. Aprotinin konnte erfolgreich für das OECA-System verwendet werden, da die Funktion des Analyse-Systems durch das Peptid nicht gestört wurde. Die zentrale Aussage der hier vorgestellten Experimente war, dass beide Aptamere, HD1-22 und HS02-52G, in ihrer biotinylierten Form in Gegenwart der Inhibitoren ihre Zielproteine binden.

Geoffrey S. Baird wies 2010 darauf hin, dass viele Aptamer-Forschergruppen sich in ihrer Arbeit auf HD1-basierte Systeme in für die Klinik nicht relevante

Probenmatrizen wie Puffern beschäftigen. Er betitelte dies als das „Thrombin-Problem“^[25] (siehe 2.1 Aptamere). Für das OECA wurde das bivalente Aptamer aus HD1 und HD22 verwendet, auf den ersten Blick handelt es sich bei dieser Studie um einen weiteren Vertreter des „Thrombin-Problems“. Doch die hier vorgestellten Daten haben zur Entwicklung eines kommerziell erhältlichen, in der klinischen Diagnostik anwendbaren Testsystems (OLIGOBIND® *Thrombin activity assay*, American Diagnostica)^[20] für Plasmaproben aus Patienten geführt. Damit wurde zum ersten Mal die direkte Analyse der Konzentration an enzymatisch aktivem Thrombin im Blut möglich. Außerdem beschränkt sich das OECA nicht nur auf die Analytik von Thrombin, sondern es wurde dasselbe System auch für APC entwickelt.^[21] Damit wurde in diesem Ansatz sowohl die Problematik der Beschränkung auf artifizielle Systeme als auch auf das HD1-Aptamer-Thrombin-Paar eindeutig überwunden.

Der ursprünglich in der Klinik zur Verlangsamung des Abbaus von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) eingesetzte Inhibitor Aprotinin blockiert unspezifisch Serinproteasen, so zum Beispiel die Protease Plasmin.^[131] Inzwischen ist Aprotinin als Inhibitor der Fibrinolyse wegen der Steigerung von postoperativem Nierenversagen vom Markt genommen worden.^[132] Diese Nebenwirkungen sind für das OECA-System irrelevant, da hierbei kein physiologischer Einsatz des Inhibitors notwendig ist. Durch die unspezifische Bindung von Oligonukleotiden wird jedoch der Einsatz von Aprotinin im OECA auf Aptamere mit hoher Affinität beschränkt. Sollte das OECA in Zukunft in Multiplex-Testsystemen angewandt werden, wäre Aprotinin als Inhibitor nur bedingt geeignet (siehe 6. Ausblick). Die Bestimmung der Affinitäten aller eingesetzten Aptamere gegen Aprotinin müsste im Vorfeld abgeklärt werden. Trotzdem verdeutlichen die Ergebnisse, dass sowohl Biotinylierung als auch der Einsatz der Inhibitoren in den Apta-Sensoren auf Basis des OECA möglich sind. Es lässt sich somit festhalten, dass Anwendungen, die auf chemisch modifizierten Aptameren basieren, der routinemäßigen klinischen Diagnostik neue Wege eröffnen. Die Thrombin- und APC-Generierung kann nun zeitnah detektiert werden. Anti- oder Prokoagulantien können je nach Status der Gerinnungsfaktoren verabreicht werden, um damit lebensbedrohliche thromboembolische Komplikationen zu verhindern.^[20-21, 133]

5.2. Strukturstabilisierung und Aktivitätssteigerung von Aptameren

Die Form des Sechsrund-(Torx®)-Schraubenziehers bietet mit seinem Davidsstern-ähnlichen Kopf mehr Halt als die Kreuzschraubenzieher. Diese Verstärkung der Interaktion durch große Drehmomentübertragung resultiert in einer besseren Leistung des Werkzeugs. Dieser Sachverhalt kann auf bestimmte, chemisch modifizierte Aptamere übertragen werden. Eine strukturelle Verstärkung der Basen-Interaktion reduziert die Freiheitsgrade der mit dem Zielmolekül wechselwirkenden Gruppen. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Aptamer vom Zielmolekül wie ein Schraubenzieher von der Schraube „abrutscht“, wird verringert. Diese Strukturverstärkung sollte in dieser Dissertation mit verdrehten interkalierenden Nukleinsäuren (TINA) und *Locked*-Nukleinsäuren (LNS) erreicht werden.

Die Gruppe um Erik B. Pedersen hatte bereits erfolgreich TINA-Modifikationen in G-Quadruplex-bindende Oligonukleotide eingebaut.^[81] Die unmittelbare Steigerung der Affinität von Aptameren zu ihrem Zielmolekül durch TINA-Modifikationen konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden. Daher wurden im HD1-Aptamer (Abbildung 13) zunächst TINA-Modifikationen vor und nach den Guanin-Basen, die am G-Quadruplex beteiligt sind, in die Sequenz eingeschoben. Dabei zeigte sich, dass zusätzliche para-TINA-Sequenz-Elemente an den Positionen 8 oder 9 die Affinität und Aktivität des Aptamers leicht verbesserten (Abbildung 14). Dies legte nahe, dass diese Region für die mit dem G-Quadruplex interagierenden Modifikationen zugänglich war. Bei den eingeschobenen TINAs wurde die TGT- beziehungsweise TT-Schleife von HD1 um eine weitere Basen-Position erweitert. Dadurch könnte die Faltung des Aptamers gestört worden sein, wodurch der strukturstabilisierende Effekt der TINA-Modifikationen nicht sein volles Potential entfalten konnte.^[19] Daher wurden in einem zweiten Ansatz einzelne Basen der TGT-Schleife durch unterschiedliche TINA-Modifikationen ersetzt. Hier konnte vor allem für die para-TINAs im Allgemeinen und speziell für die para-TINA-Modifikation an Position 8 eine Steigerung der thermischen Stabilität von 36,1 °C für das Wildtyp-Aptamer auf 52,4 °C (Tabelle 1) und einen Anstieg der Affinität von $116,3 \pm 8,2$ nM für das Wildtyp-Aptamer auf $3,5 \pm 0,7$ nM (Abbildung 15) bei erhaltener G-Quadruplex-Struktur (Abbildung 16) für die Variante HD1-r8P beobachtet werden. Dies resultierte in einer erhöhten inhibitorischen Aktivität, sprich einer Verlängerung der Gerinnungszeit um 79,6 % dieser TINA-Modifikation im Vergleich zum Wildtyp-Aptamer (Abbildung 17).

Die planare TINA-Struktur schien sich über dem planaren G-Quadruplex anzuordnen und über π - π -Wechselwirkungen dessen Anordnung zu stabilisieren. Dies ergab sich aus Kernspinresonanzspektroskopie-Messungen von Michael Petersen und Erik B. Pedersen vom Nucleic Acids Center der University of Southern Denmark.^[17a] Die Position der Phenyl-Gruppe und damit die Reichweite der Pyren-Gruppe (Abbildung 12) schien einen signifikanten Einfluss auf die strukturverstärkende Wirkung zu haben, da para-TINA an Position 8 die

Eigenschaften des Aptamers deutlich verbesserte, während eine ortho-TINA-Modifikation nur marginale Veränderungen der Attribute des Oligonukleotids bedeutete (Abbildung 15, 16 und 17).

Für das anti-HIV-1-Integrase Oligonukleotid T30177 konnte bereits gezeigt werden, dass der Einbau von TINA-Modifikationen in ein G-Quadruplex-Aptamer einen Einfluss auf den biologischen Effekt haben kann. In diesem Fall steigerten sie, als eine sehr indirekte Endpunktmessung, die metabolische Aktivität von HIV-infizierten Zellen.^[81] Mit HD1-r8P konnte nun erstmals demonstriert werden, dass eine Verbesserung der biologischen Aktivität, hier einer antikoagulativen Wirkung, in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten Affinität zu seinem Zielmolekül steht.

Wurde das HD1-r8P-Molekül in das bivalente Aptamer HD1-22 eingebaut, reduzierte sich die Affinität an Thrombin von $1,88 \pm 0,21$ nM für das Wildtyp-Aptamer auf $0,25 \pm 0,02$ nM. Die gerinnungshemmenden Eigenschaften wurden gesteigert, die Gerinnungszeit im Blutplasma verlängerte sich um 37,4 % im Vergleich zu unmodifiziertem HD1-22 (Abbildung 18). HD1-22 besteht aus HD1 und dem ebenfalls G-reichen, Exosite II bindenden Aptamer HD22, die über eine poly-T-Brücke miteinander verbunden sind.^[63] Die Verbesserung der inhibitorischen Aktivität des HD1-r8P-Moleküls und dessen erfolgreicher Einbau in das HD1-22-Molekül verdeutlicht das Baukastenprinzip, das mit Aptameren möglich ist. Funktionale Oligonukleotid-Sequenzen können mit nicht-funktionalen Verbindungsstücken verknüpft werden. Dies macht die Adressierung mehrerer Positionen und damit Funktionen auf großen Molekülen wie Proteinen möglich. Werden nun einzelne Bestandteile dieser bi- oder multivalenten Aptamer-Systeme durch TINA-Gruppen chemisch modifiziert, könnte deren inhibitorische Aktivität ebenfalls gesteigert werden. Auf diese Weise eröffneten sich neue Perspektiven in der Aptamer-Technologie, da demonstriert werden konnte, dass durch die Stabilisierung einzelner Strukturelemente die biologische Aktivität des Gesamt-Moleküls erhöht wurde.

Nach dem erfolgreichen Einbau von TINA-Modifikationen in HD1 war der nächste logische Schritt im Baukastensystem der Aptamere die Eigenschaften von HD22 durch TINAs zu verbessern. In ihrer Publikation zur Selektion von HD22 schlugen Tasset et al. eine Struktur für das Aptamer vor, die einen antiparallelen, zweilagigen G-Quadruplex, ähnlich der Struktur von HD1, beinhaltet (Abbildung 42 a).^[61] Dieses Modell wurde die letzten 15 Jahre seit seiner Entwicklung nicht in Frage gestellt und war Grundlage weiterer Studien zu HD22.^[134] Es konnten in dem HD22-Molekül mit C15, A16 und G23 Positionen identifiziert werden, die keinen Einfluss auf die Bindung des Aptamers an Thrombin hatten (Abbildung 19 und ^[85]). Diese Positionen waren demnach für die Modifikation mit TINA-Gruppen geeignet. Nach der Struktur von Tasset et al. waren die Positionen G6, T7 und G14 in unmittelbarer Nähe zu dem G-Quadruplex lokalisiert. Aus diesem Grund wurden auch hier TINA-Modifikationen in das HD22-Molekül eingebracht, obwohl diese Positionen in den Punktmutationsstudien als nicht geeignet identifiziert worden waren. Die Bindungsstudien zu den Benzopyren-modifizierten Strukturen ergaben, dass alle in Abbildung 42 a aufgeführten TINA-Varianten zu einer

drastischen Reduktion der Affinität des Oligonukleotids an das Enzym führten (Abbildung 21).

Kürzlich wurde eine Kristall-Struktur zu HD22 veröffentlicht.^[62] Diese stellt HD22 in der Anordnung eines pseudo-G-Quadruplexes mit einer G-Tetrade dar (Abbildung 42 b). In dieser Struktur befinden sich die Positionen der TINA-Modifikationen nicht mehr in unmittelbarer Nähe zu der G-Tetrade. Außerdem gibt es bisher keine Daten, ob grundsätzlich eine Stabilisation eines pseudo-G-Quadruplexes durch eine TINA-Modifikation möglich ist. Dies erklärt die nicht erfolgreiche Bindungssteigerung durch die Modifikationen in HD22. Die Kristallstruktur wurde jedoch leider erst nach dem Beenden dieser Arbeit veröffentlicht.

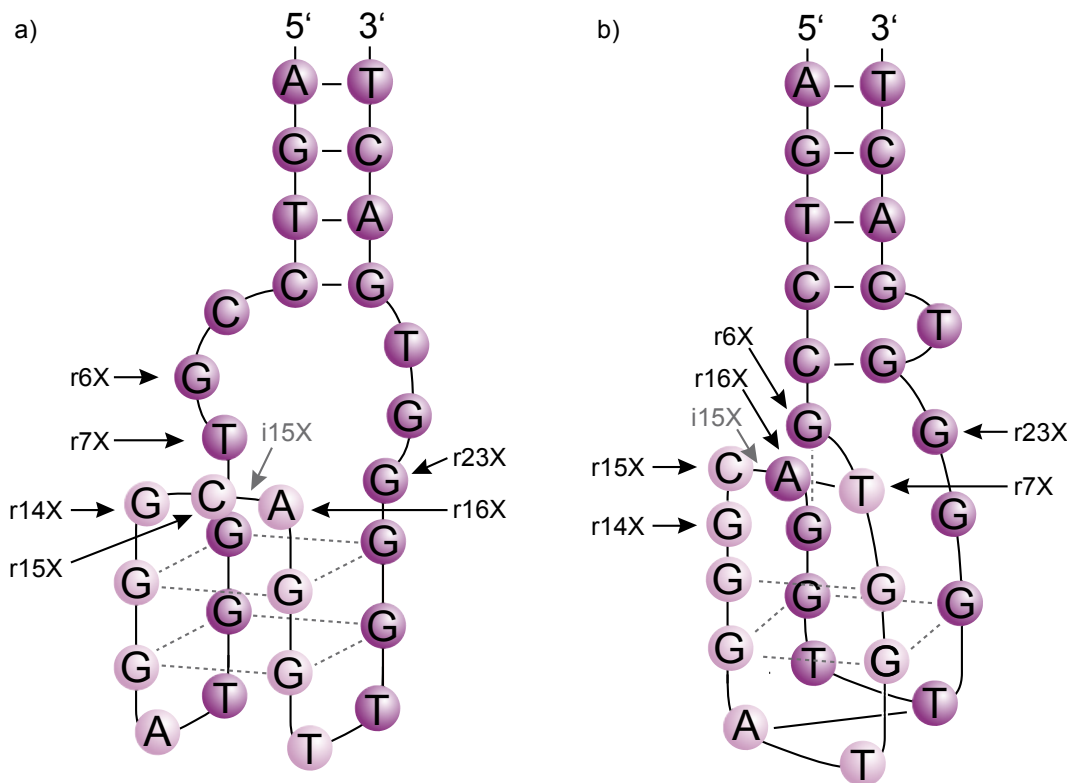


Abbildung 42. HD22 besitzt laut seiner Kristallstruktur einen pseudo-G-Quadruplex. Strukturmodelle von HD22. a) HD22 mit antiparallelem, zweilagigem G-Quadruplex nach NMR-Voraussagen durch Tasset et al.^[61] b) HD22 mit pseudo-G-Quadruplex nach einer Kristallstruktur von Russo-Krauss et al.^[62] Die Positionen der TINA-Modifikationen sind entsprechend gekennzeichnet.

Ausgehend von diesen neuen Strukturinformationen von Russo-Krauss et al. sind die Bindungsdaten der HD22-A16T Mutante überraschend. Wird das A16 durch T16 substituiert, ist die Basen-Paarung von A16 zu T7 nach dem Modell nicht mehr möglich (Abbildung 42 b). Dies könnte Einfluss auf die Gesamtstruktur des Aptamers und damit die Affinität haben. HD22-A16T zeigte jedoch ein kaum verändertes Bindungssignal zu Thrombin im Vergleich zu unmodifiziertem HD22 (Abbildung 19).

Nachdem die chemische Modifikation mit TINAs für HD22 nicht zu einer verstärkten Bindung an Thrombin führte, wurde der Einsatz von *Locked* Nukleinsäuren in Betracht gezogen. LNS steigern die Stabilität von Nukleinsäure-Duplexen.^[135] Für das Aptamer TD05 konnte mit einer LNS-Modifikation in der Stammschleifenstruktur die Resistenz gegen den Abbau durch Nukleasen gesteigert werden, was zu einer höheren Stabilität im Plasma führte.^[77] Die Fluoreszenz-markierte, LNS-modifizierte Version von TD05 verlängerte die Detektionszeit in der Fluoreszenzmikroskopie senkte damit das Detektionslimit.^[78] Ein Avidin-bindendes Aptamer erlangte durch den Einbau einer LNS eine Affinitätssteigerung um das 8,5-fache.^[76] Hier lag allerdings keine Stammschleifenstruktur im Aptamer vor.

In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob der Einbau von LNS in die Stammschleife des Exosite II bindenden Aptamers HD22 dessen Affinität steigert. HD22 bildet nach der Kristallstruktur von Russo-Krauss et al. eine Stammschleife von Base 1 bis 5 und 24 bis 29 mit einem an Position 25 herausstehendem T aus (Abbildung 42 b).^[62] Eine Verstärkung des Duplexes in der Stammschleife könnte eine Verringerung der Freiheitsgrade der mit dem Zielmolekül interagierenden Gruppen des Aptamers zur Folge haben. Die Dissoziation würde damit erniedrigt und das Bindungssignal erhöht. Die in die Stammschleife eingebauten LNS-Modifikationen führten allerdings nicht zu einer signifikanten Änderung der Bindung (Abbildung 29). Für das LNS-Avidin-Aptamer begründete sich die Affinitätssteigerung nicht in einer Erhöhung der Stabilität einer Stammschleife. Das Stammschleifen-Aptamer TD05 zeigte keine Affinitätssteigerung, aber eine erhöhte Nuklease-Resistenz. Es ist also durchaus möglich, dass die HD22-LNS-Varianten eine erhöhte Nuklease-Resistenz ähnlich den TD05-Varianten aufweisen, was hier nicht untersucht wurde. Abgesehen davon wurde immer nur eine LNS in das Molekül eingebaut. Mehrere dieser Modifikationen könnten einen größeren stabilisierenden Effekt erzielen.

Wie wichtig Informationen über die Struktur eines Aptamers für dessen erfolgreiche chemische Modifikation sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur für HD22, sondern auch bei dem für Ramos-Zellen spezifische Aptamer C10.36 deutlich. Für dieses Aptamer wurde zunächst von einer Struktur mit einem antiparallelen G-Quadruplex mit 2 G-Tetraden ausgegangen.^[39] Nach diesem Strukturmodell wurden TINA-Modifikationen in unmittelbarer Nähe des G-Quadruplexes in das Aptamer eingebaut (Abbildung 43 a). Diese sollten in dem von Raddatz et al. vorgestellten Bindungstest in einem Durchflusszytometer analysiert werden.^[38] Wurden C10.36 und dessen TINA-modifizierte Varianten auf diese Weise untersucht, war eine kontinuierliche Steigerung des Fluoreszenzsignals der Bindung im Durchflusszytometer in Abhängigkeit zur Aptamer-Konzentration zu beobachten (Abbildung 23). Die Bestimmung einer Dissoziationskonstante, wie sie für das Volllängen-Aptamer C10 von Raddatz et al. gezeigt wurde, war nicht möglich. Das Bindungssignal erreichte keine Sättigung. In vorausgegangen Studien wurden Hinweise gefunden, dass C10.36 über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose in die Ramos-Zellen aufgenommen wurde.^[39] Diese These wurde durch die nicht erreichte Sättigung

untermauert, da sich bei einer kontinuierlichen Aufnahme des Aptamers ins Zellinnere kein Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation einstellt. In diesem Fall kann keine Bindungskonstante an die Zellhülle ermittelt werden.

Aus diesem Grund wurden die C10.36-TINA-Varianten in dem Wettbewerbs-Testsystem untersucht. Position 25 wurde als eine Base identifiziert, die die TINA-Gruppen zumindest toleriert (Abbildung 24). Allerdings zeigten die anderen modifizierten Aptamere verringerte bis gar keine Wettbewerbs-Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp-C10.36. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die G-reiche Region von C10.36 nach ihrer Sequenz nicht zwangsläufig einen zweilagigen antiparallelen G-Quadruplex (Abbildung 43 a) ausbilden muss, sondern auch ein dreilagiger paralleler G-Quadruplex (Abbildung 43 b) möglich wäre, wurden CD-Messungen durchgeführt. Diese deuteten stark auf einen parallelen, wie in Abbildung 43 b dargestellten G-Quadruplex hin (Abbildung 25). Unterstützt wird dieses Modell des parallelen G-Quadruplexes auch durch die Aufnahme des Aptamers durch die Ramos-Zellen. Parallele G-Quadruplex-Strukturen werden laut einer aktuellen Studie wesentlich wahrscheinlicher von Zellen aufgenommen.^[58]

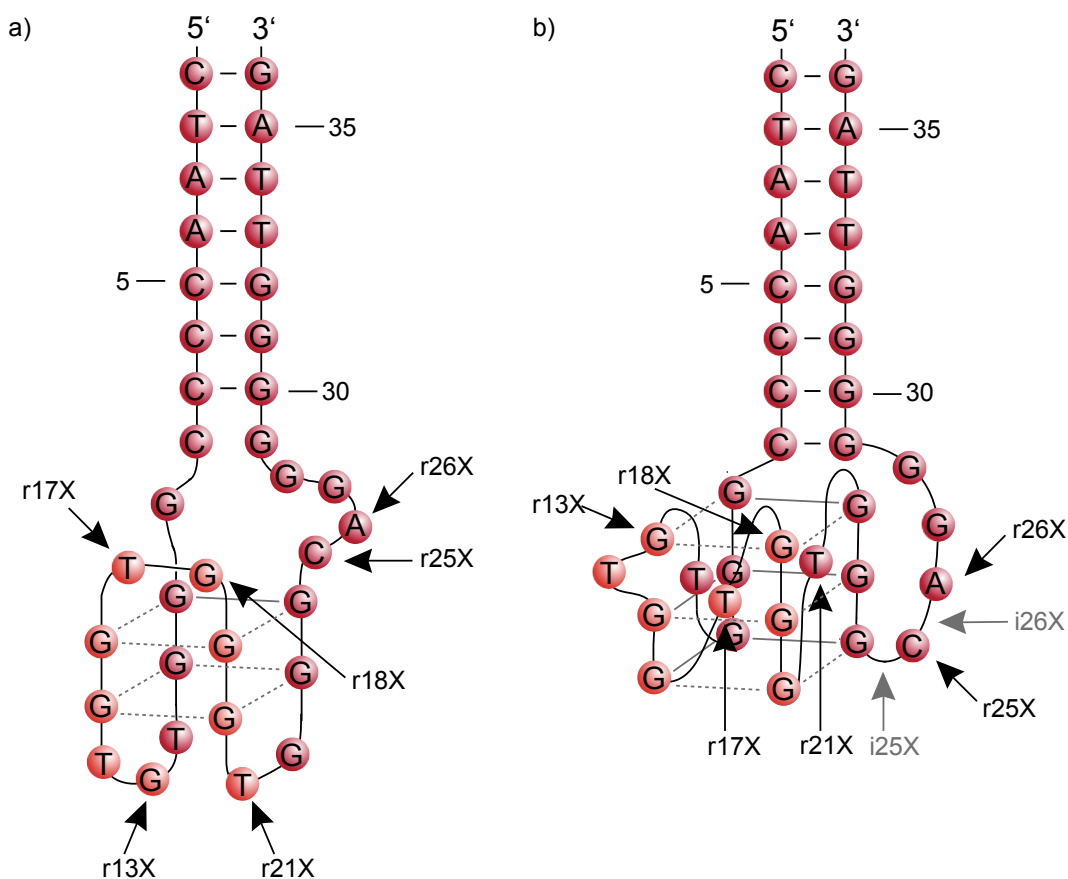


Abbildung 43. Die Strukturinformationen zu einem Aptamer sind entscheidend für den Erfolg einer chemischen Modifikation. C10.36-Strukturmodelle. a) C10.36 als zweilagiger antiparalleler G-Quadruplex. b) C10.36 als dreilagiger paralleler G-Quadruplex, abgeleitet aus Circular dichroismus-Daten. Die Positionen der TINA-Modifikationen sind entsprechend gekennzeichnet.

Die CD-Daten sprechen auch für einen parallelen G-Quadruplex in der Punktmutante C10.36-G24A, dort allerdings vermutlich nur mit 2 G-Tetraden (Abbildung 25). C10.36-G24A wurde in vorherigen Studien^[122] sowie in dieser Arbeit als Negativkontrolle benutzt. Da durch die CD-Messung offensichtlich wurde, dass das Aptamer nach wie vor eine G-Quadruplex-Struktur einnimmt, sollte in Zukunft eine Mehrfach-Punktmutante, bei der sich keinerlei Sekundärstrukturen ausbilden können, verwendet werden.

Die TINA-Modifikationen an Position 13, 17, 18 und 21 lagen in dem Modell des dreilagigen parallelen G-Quadruplexes innerhalb der G-Quadruplex-Struktur und störten daher wahrscheinlich dessen Ausbildung. In der Literatur finden sich Hinweise, dass nicht nur antiparallele, sondern auch parallele G-Quadruplexe durch TINA-Modifikationen stabilisiert werden konnten.^[81] Da Position 25 außerhalb, aber in direkter Nähe der gestapelten G-Tetraden liegt, wurden rund um diese Position weitere TINA-Moleküle eingebaut. Diese zeigten ähnliche bis schlechtere Konkurrenzseigenschaften im Vergleich zu dem Wildtyp-Aptamer. Insgesamt konnte keine TINA-Modifikation von C10.36 gefunden werden, die erhöhte Konkurrenzseigenschaften aufwies.

Da die TINA-Varianten nicht die erhofften verbesserten Bindungseigenschaften aufwiesen, wurden auch keine Schmelzkurvenbestimmungen durchgeführt. Es wurde also nicht geklärt, ob die TINA-Modifikationen einen Einfluss auf die Stabilität des C10.36-Aptamers haben. Die Analyse der thermischen Stabilität könnte allerdings helfen, den Einfluss der TINA-Modifikationen besser zu verstehen.

Die chemische Modifikation durch TINAs und LNS war in dieser Arbeit nur für das Thrombin-Aptamer HD1 erfolgreich. Es könnte also der Eindruck entstehen, dass das von Baird beschriebene „Thrombin-Problem“ greift, welches die Konzentration von Forschungsbemühungen auf artifizielle Systeme mit HD1 illustriert.^[25] Bei näherer Betrachtung wird aber offensichtlich, dass in dieser Arbeit neben dem Modellcharakter der HD1-TINA-Modifikation auch das Baukastenprinzip für Aptamere deutlich wurde. Durch die Verbesserung der Eigenschaften eines Moduls, HD1, wurde die Leistung des bivalenten Systems, HD1-22, erhöht. Diese Leistung wurde nicht nur in Puffersystemen als Bindung, sondern auch als inhibitorische Aktivität in humanem Plasma, also klinisch relevanten Proben, beziffert. Außerdem wurde versucht, das Prinzip der TINA-Modifikation auf andere Aptamere, HD22 und C10.36, zu übertragen. Die Forschungsbemühungen wurden nach dem Erfolg bei HD1 nicht auf dieses Modellsystem beschränkt. Dabei wurde ersichtlich, dass die Informationen über die Strukturen von Aptameren maßgeblich die erfolgreiche Implementierung von chemischen Modifikationen bestimmen.

5.3. Lichtsensible Modifikationen

Bei dem Einbau von photo-lablen Schutzgruppen, dem sogenannten *caging*, sowie dem photo-Schalter Azobenzol in HD1 waren die Strukturinformationen über das Aptamer durchaus von Bedeutung. Bei Azo-HD1 wurde offensichtlich, dass der massive Eingriff in die Faltung des Aptamers zum Verlust der Affinität führen kann. Dort wurden die drei Basen der TGT-Schleife durch die Azobenzol-Gruppe ersetzt (Abbildung 47). Die Affinität des chemisch modifizierten Aptamers steigerte sich nur minimal nach der Bestrahlung mit UV-Licht (Abbildung 30). Bei dieser Belichtung sollte sich der Azobenzol von der *trans*-Konformation in die *cis*-Ausrichtung umlagern. Es könnte sein, dass die Intensität der Bestrahlung nicht ausreichte, um die Konformationsänderung zu induzieren. Für andere Azobenzol-Anwendungen konnte allerdings gezeigt werden, dass das verwendete UV-Bestrahlungsgerät durchaus diese Strukturänderung verursacht.^[136] Es ist eher davon auszugehen, dass sich durch die Einführung der Azo-Gruppe als Ersatz von 3 Nukleobasen, ein erheblicher Eingriff in die Aptamer-Sequenz, die Ausrichtung der interagierenden Gruppen derart ändert, dass die Bindung an das Zielmolekül gestört ist. Es wird abermals deutlich, dass Informationen über die Aptamer-Struktur und dessen Änderungen essentiell für den Erfolg einer chemischen Modifikation sein können.

Die Strukturänderung durch photo-labile Schutzgruppen ist hingegen gut untersucht. Schlüsselpositionen, die für die Interaktion mit dem Zielmolekül ausschlaggebend sind, werden blockiert und zum gewünschten Zeitpunkt am gewünschten Ort freigegeben.^[83] Durch die Einführung von photo-lablen Schutzgruppen in HD1 beziehungsweise in die Konsensus-Verlängerung der HD1-Sequenz kann das Aptamer lichtabhängig aktiviert oder inaktiviert werden (Abbildung 4).^[83, 87a] Allerdings besitzt das Aptamer mit ca. 100 nM (siehe Abbildung 33 a) eine vergleichsweise hohe K_d und weist *in vivo* eine Halbwertszeit von nur 1,5 min im Blut auf.^[109] Es ist eher unwahrscheinlich, dass sich mit diesem System in einer komplexen Matrix wie einem lebenden Organismus das Protein durch das Aptamer inhibieren und durch Licht wieder aktivieren ließe. Ein Ziel dieser Arbeit war jedoch, die lichtgesteuerte Aktivierung von Epitopen auf Proteinen zu realisieren.

Um Epitope auf Enzymen lichtaktivierbar zu machen, könnten neben *cage*-Aptameren alternativ photo-labile Schutzgruppen mittels *cage*-Aminosäuren und Festphasensynthese in die entsprechenden Proteine eingeführt werden. Diese Methode ist jedoch aufwendig und nur für kurze Peptide geeignet.^[137] Die Einführung von lokal photo-labil geschützten Aminosäuren in größere Proteine konnte durch die translationale Inkooperation von nicht natürlichen Aminosäuren mit *cage*-Modifikationen in entsprechenden Expressionssystemen realisiert werden.^[138] Dies setzt wiederum die Einführung orthogonaler Aminoacyl-tRNS-Synthetase/tRNS-Paare in die zu untersuchenden Zellen voraus, was oft schwer zu realisieren ist.^[139] Die Darstellung eines lichtaktivierten Proteins über eine Vielzahl an zufällig verteilten photo-labil geschützten Aminosäuren ist strategisch

nicht sinnvoll, da es neben der Inhibition des gewünschten Epitops oft zu einer unspezifischen Blockierung aller Proteinfunktionen führte.^[140]

In dieser Arbeit wurde daher ein komplett neuer Ansatz gewählt. Das HD1-Aptamer, das *in vitro* die Exosite I von Thrombin erkennt, wurde durch einen lichtspaltbaren, kovalenten Verknüpfen auf Basis des o-Nitrophenyl-propyl-cages mit dem Enzym verbunden (Abbildung 31). Dies hatte eine Inhibition der Assoziation von Fibrinogen an Thrombin zur Folge, die gerinnungsaktivierende Eigenschaft des Enzyms war blockiert. Bei Bestrahlung des Komplexes mit UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) wurde der Verknüpfen gespalten. Das Aptamer gab nun die Exosite I wieder frei und Thrombin konnte Fibrinogen zu Fibrin schneiden und damit die Bildung des Blutgerinnsels vorantreiben (Abbildung 32). Die im Zuge dieser Arbeit neu entwickelte Technik der kovalenten, photo-spaltbaren Verknüpfung eines ein bestimmtes Epitop erkennenden Aptamers mit seinem Zielprotein wurde als Aptamer-basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES) definiert.

Der Komplex aus Enzym und ABES konnte per Western Blot visualisiert werden (Abbildung 34). In der Literatur gab es Hinweise darauf, dass HD1 nicht selektiv nur Exosite I bindet, sondern auch schwache Interaktionen mit Exosite II eingeht.^[128b] Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass für die hohen Aptamer-Konzentrationen, die bei der Ausbildung des Komplexes benötigt werden, eine Verbindung aus zwei Aptameren mit Thrombin entsteht (Abbildung 35). Dieser ternäre Komplex konnte durch die Zugabe des Exosite II bindenden Aptamers HD22 unterbunden werden. Es ist davon auszugehen, dass sich hier die bereits in der Literatur angedeutete simultane Bindung von HD1 an das Ziel-Epitop Exosite I und an die Exosite II bestätigt.

Die Exosite II vermittelt die Bindung von Glykosaminoglykanen wie Heparin, welches wiederum die Bindung von Serpinen wie Antithrombin III oder Heparin Cofaktor II und damit die Inaktivierung von Thrombin verstärkt.^[100] Ist dieses Epitop blockiert, wird die physiologische Schutzfunktion des Organismus vor ungewollten Blutgerinnseln ausgeschaltet, was zu Ischämien führen kann. In dem hier vorgestellten Ansatz der ABES von Thrombin wäre eine simultane Inhibition von Exosite I und II unproblematisch gewesen, da durch die Bestrahlung nicht nur die Fibrinogen- sondern auch die Heparin-Bindestelle wieder freigegeben worden wäre. Da aber neben der lichtabhängigen Gerinnungsaktivierung auch die generelle Modellfunktion der ABES mit dem Protein-Aptamer-Paar Thrombin-HD1 demonstriert werden sollte, wurde die Ausbildung des ternären Komplexes durch Zugabe von HD22 in die *cross-link* Reaktion verhindert. Damit bildete sich ausschließlich der 1:1-Komplex von Thrombin und HD1, der nach Aufreinigung in den funktionalen Testsystemen eingesetzt wurde. Durch diesen Befund wurde allerdings deutlich, dass ein Aptamer, das zunächst spezifisch für ein bestimmtes Protein zu sein scheint, auf diesem Protein unterschiedliche Epitope erkennen kann.

Es blieb zu untersuchen, ob diese Interaktion eine unspezifische Wechselwirkung aufgrund der hohen Konzentration war oder es zu einer spezifischen Interaktion mit der Exosite II kam. Für die unspezifische Wechselwirkung sprach, dass die

Punktmutante HD1-T4A bis zu einer Konzentration von 1 μM nicht mit Thrombin interagierte (Abbildung 33 c). In den hohen Konzentrationen der *cross-link* Reaktion mit über 100 μM Aptamer zeigte HD1-T4A ebenfalls eine Interaktion mit Thrombin. Diese Interaktion ließ sich fast vollständig mit HD22 inhibieren, was eine Bindung von HD1-T4A an Exosite II nahelegte (Abbildung 36). Die positiv geladene Exosite II scheint also generell mit negativ geladenen Oligonukleotiden zu interagieren. HD1 wird in verschiedensten Anwendungen eingesetzt.^[97] Für Systeme, die HD1 verwenden und bei denen die Funktion der Exosite II essentiell ist, muss die in dieser Arbeit gefundene, wahrscheinlich unspezifische Bindung von HD1 an das Heparin-bindende Epitop berücksichtigt werden.

In dem hier vorgestellten ABES-Ansatz wurde die Interaktion von HD1 durch Konkurrenz auf die Exosite I begrenzt. Die Blockade und lichtabhängige vollständige Freigabe des Epitops wurde durch den Hirudin-Test sichergestellt (Abbildungen 38). Dort zeigte sich, dass Thrombin nach dem *cross-link* vor der Inhibition durch Hirudin geschützt war (Abbildung 39). Die Bestrahlung hob den Schutz auf, Hirudin inaktivierte Thrombin über die Exosite I. Die Inhibition der Koagulationsaktivität, welche für das ABES-Thrombin-System durch Bestrahlung wieder rückgängig gemacht werden konnte, wurde durch den Plasma-Gerinnungstest gezeigt. Es war keine Koagulation vor Bestrahlung erkennbar (Abbildung 40 a). Durch die UV-Behandlung konnte die Thrombinaktivität wieder hergestellt werden, allerdings stellte sich diese im Vergleich zu den Kontrollen langsamer ein (Abbildung 40 b). Dies konnte mit den Experimenten zu der Aufreinigung durch magnetische *beads* mit HD1-bio-Oberfläche erklärt werden. Die Proteinmengen vor und nach der Aufreinigung beziehungsweise auf den *beads* wurden per Western Blot dargestellt. Dort wurde deutlich, dass ein Teil des Thrombins, welches in den *cross-link* eingesetzt wurde, nach dem Reaktionsprozess nicht kovalent mit HD1 verbunden war und auch keine Interaktion mehr mit dem Aptamer eingehen konnte (Abbildung 37). Dieser Part des Proteins schien durch die Reaktionsbedingungen, vor allem wahrscheinlich durch die 15 %Vol Dimethylsulfoxid im Reaktionsgemisch, Denaturierungsprozesse durchlaufen zu haben. Dieser Anteil an Lösemittel konnte nicht reduziert werden, da das für den *cross-link* verantwortliche Molekül, sulfo-EGS, in 100 %Vol Dimethylsulfoxid in die Reaktion eingebracht werden musste, um seine vorzeitige Hydrolyse zu verhindern. Die Menge an nicht reaktivem Thrombin betrug in den finalen Reaktionsbedingungen ca. 20 % (Abbildung 34). Im Vergleich zu den anfänglichen Verlusten von ca. 50 % (Abbildung 35) war dieser Wert durchaus akzeptabel.

Die Orts- und Zeitauflösung der Aktivierung von Proteinen ist der große Vorteil von photo-labilen Schutzgruppen. Um diese räumliche und zeitliche Kontrolle darzustellen, wurde die lichtabhängige Gerinnungsaktivierung einer Fibrinogen-Lösung durch den Thrombin-HD1-Komplex in einer Glaskapillare aufgenommen. Diese lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten die lokale Gerinnungsbildung nach Bestrahlung eines bestimmten Bereichs illustrieren (Abbildung 41). Dasselbe Experiment wurde auch in humanem *pool*-Plasma durchgeführt. Dort war die Aktivierung des *cross-links* häufig nicht erfolgreich. Vermutlich reichte

aufgrund der Absorption des Plasmas die Energie der Lichtquelle nicht aus, die photo-Spaltung zu induzieren. Außerdem zeigte sich mehrfach spontane Gerinnung ohne Bestrahlung. Hier war davon auszugehen, dass eine Kontaktaktivierung (siehe 5 Gerinnungskaskade) an der Glasoberfläche stattfand. Um die Aktivierung der ABES von Thrombin im Plasma darzustellen, sollte daher in Zukunft eine entsprechend starke Lichtquelle und Gefäße mit weniger stark geladenen Oberflächen verwendet werden.

Trotzdem demonstrierte die Gesamtheit der oben genannten Experimente die Realisation der Kanalisierung des *cross-links* von HD1 an die Exosite I und damit der Inhibition der Gerinnungsaktivität sowie der lichtabhängigen Reaktivierung der Koagulationsfähigkeit der ABES von Thrombin. Dies ist die erste *caging*-Methode, welche die selektive Maskierung von kompletten Proteindomänen ermöglicht.

Die Verwendung von Thrombin als Zielprotein hat nicht nur Modellcharakter, sondern eröffnet auch den Weg zu einer Vielzahl an biomedizinischen Anwendungen. Lokal induzierte Blutgerinnung kann ein sehr potentes Werkzeug zur Einschränkung der Blutzufuhr von Tumoren oder aber zur Unterbindung von unkontrollierten Blutungen in Notfall-Situationen sein. Aktivierbares Thrombin könnte von Vorteil gegenüber dem Einsatz hämostatischer Mittel wie rekombinantem aktiviertem Faktor VII sein, da Nebenwirkungen wie lebensbedrohliche thromboembolische Komplikationen minimiert werden. Zusammen mit den OECA-Systemen könnte der Status des Gerinnungssystems gemessen werden. Bei nicht ausreichender Menge an Prokoagulantien würde der ABES-Komplex von Thrombin verabreicht und an der Blutungsstelle lokal aktiviert.^[130]

Es ist also häufig gar nicht die Entwicklung eines komplett neuen Werkzeugs nötig. Vielmehr machen die kreativen chemischen Modifikationen der vorhandenen Elemente verbesserte Eigenschaften oder neue Anwendungen möglich. Da über den evolutionären Selektionsprozess auch weiterhin neue Aptamere gefunden werden, die wiederum mit den hier vorgestellten Modifikationen ausgestattet werden können, ist dieses Potential bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Die Werkzeugkiste der Chemischen Biologie hat noch viele Fächer frei.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Systeme bereichern die Werkzeugkiste der Chemischen Biologie. Sowohl für die klinische Diagnostik, als auch für die molekularbiologische Forschung, konnten mit den hier vorgestellten Aptasensoren, stabilisierenden Modifikationen und vor allem den neu entwickelten Aptamer-basierten Epitop-Schutzgruppen Ansätze für Anwendungen von chemisch modifizierten Aptameren hervorgebracht werden. In Zukunft können diese Systeme auf weitere Aptamere übertragen werden. Gegen ein weites Spektrum an Zielmolekülen wurden bereits Aptamere selektiert. Durch den im Vergleich zu Antikörperentwicklung relativ simplen Selektionsprozess können in Zukunft zusätzliche Aptamere identifiziert werden. Auf diese Weise werden sich die Applikationen der hier vorgestellten Techniken nicht nur auf den Gerinnungsprozess, beziehungsweise das Modellprotein Lysozym, beschränken.^[9]

Die Siebdruck-Elektrode mit durch Kohlenstoffnanoröhren vergrößerter Oberfläche kann von Lysozym gelöst und auf komplexere Zielmoleküle übertragen werden. Die einfache chemische Modifikation der terminalen Aminogruppe ist mit nahezu jedem Aptamer möglich. Theoretisch können mit diesem System alle Proteine, gegen die ein Aptamer entwickelt wurde, analysiert werden. Wichtig ist allerdings, dass diese Analyse auch in komplexen Matrizen, wie Patienten- oder Umweltproben, möglich ist. Es wäre also interessant, zu untersuchen, ob dieses System auch bei der Analyse von Gemischen verschiedener Proteine bis hin zu Proben aus Körperflüssigkeiten noch funktional ist.

Dieses Kriterium erfüllt das Oligonukleotid-basierte Ergreifen von Enzymen (*oligonucleotide-based enzyme capture assay*, OECA) bereits. Messungen der enzymatischen Aktivität von Proteinen aus Vollblutproben waren hiermit möglich. Allerdings wurde in diesem Ansatz immer nur ein isoliertes Protein untersucht. In der Diagnostik wird in Zukunft aber mehr Multiplexing notwendig werden. Der Kosten- und Zeitdruck in der klinischen Routine-Analytik macht die simultane Messung vieler Parameter erforderlich.^[141] Die SOMAmers haben bereits demonstriert, dass solche Multiplexing-Methoden mit modifizierten Aptameren realisierbar sind.^[5] Sogenannte *Sandwich*-Systeme sind in ihrer Anwendung häufig durch *cross*-Reaktivitäten der dort eingesetzten Antikörper limitiert.^[4, 7] Hier ist der Einsatz von Aptameren von Vorteil, da die Problematik der *cross*-Reaktivitäten entfällt.

Das OECA hat durchaus Potential für den Einsatz in einem Multiplex-System. Die simultane Messung von mehreren Gerinnungsparametern würde die klinische Arbeit deutlich erleichtern. In diesem Fall wäre allerdings der Einsatz von spezifischen Inhibitoren angebracht, vor allem sollte auf die Spezifität der Aptamere gegenüber den Zielproteinen und Inhibitoren geachtet werden. Aprotinin ist also hier nur bedingt geeignet. Andere APC-Inhibitoren auf Peptid-

Basis binden allerdings dessen basische Exosite und damit die Bindungsstelle von HS02-52G.^[142] Hier wird deutlich, dass ein Bedarf an einem APC-Inhibitor in Form einer niedermolekularen organischen Verbindung besteht.

In HD1 konnten erfolgreich TINA-Modifikationen eingebaut werden. Die gerinnungshemmenden Attribute des Oligonukleotids wurden durch eine Stabilisierung des G-Quadruplexes durch eine TINA-Modifikation verstärkt. Eine Vielzahl an anderen Aptameren, wie C10.36, das anti-HIV-1-Integrase-Aptamer T30177 oder AS1411 tragen einen G-Quadruplex.^[143] Die Möglichkeiten der Erhöhung der Stabilität und damit der inhibitorischen Eigenschaften scheinen also groß. Die Ergebnisse zur Einführung der TINA-Modifikationen in HD22 und C10.36 zeigen allerdings, dass mangelnde Informationen zur Struktur des Aptamers den Einbau der chemischen Variation durchaus erschweren. In Zukunft sollten vor der Modifikation zunächst umfassende Daten zum Aufbau der Oligonukleotide gewonnen werden. Ideal wären hier hochauflösende Röntgenkristallstrukturen. Detaillierte Informationen zur Anordnung der Nucleobasen ermöglichen eine geradlinige Strategie der chemischen Modifikation. Position und Art der Modifikation können genauer geplant werden. Daraus ergeben sich höhere Erfolgswahrscheinlichkeiten für die Verbesserung der Aptamer-Funktion.

Neue Aptamer-Varianten mit verstärktem Effekt können nach dem Beispiel von HD1 und HD1-22 in einem bivalenten oder auch multivalenten Oligonukleotid eingebaut werden. Die Kombination verschiedener Aptamere zu multivalenten Funktionskomplexen wird in Zukunft eine immer größere Rolle spielen.^[144] Dieses Baukastenprinzip chemisch modifizierter Aptamere könnte zum Beispiel für C10.36 genutzt werden, um die Zielzellen des Oligonukleotids spezifisch zu markieren. Da das Oligonukleotid in die Zellen aufgenommen wird,^[39] könnte es zusätzlich andere Moleküle durch die Zellmembran transportieren, wie es bereits für AS1411^[48] und TD05^[50] gezeigt wurde. Während AS1411 an viele verschiedene Tumorarten bindet^[145] und TD05 stark verringerte Bindung bei 37 °C zeigt^[34], ist mit C10.36 ein für Ramos-Zellen spezifisches, bei Körpertemperatur bindendes Transportmedium vorhanden. So wäre auch vorstellbar, einen Komplex aus ABES und Protein, fusioniert an ein zellgängiges Aptamer wie C10.36, in eine Zelle einzubringen. Die ABES könnte dann innerhalb der Zelle lichtaktiviert werden und ein Protein freigegeben, das seine Funktion im Zytosol entfaltet. Auf diese Weise könnten molekularbiologische Vorgänge gezielt und nicht-invasiv gesteuert werden.

Die Thrombin-HD1-ABES, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde, ist mit einem o-Nitrophenyl-propyl-*cage* ausgestattet. Um die kovalente Verknüpfung zwischen Aptamer und Protein zu spalten, wird UV-Bestrahlung benötigt. Für die Anwendung zum Beispiel in Vollblut wäre dadurch eine sehr starke Strahlungsquelle nötig, um die Lichtaktivierung zu realisieren. Für zukünftige Anwendungen wäre ein System geeignet, das bei längeren Wellenlängen, die tiefer in Körperflüssigkeiten und Gewebe eindringen können, operiert. So existiert mit der Zweiphotonen-Technik die Möglichkeit, die Anregung mit Licht der doppelten Wellenlänge, in diesem Fall also im Infrarot-Bereich, durchzuführen.

Die o-Nitrophenyl-propyl-(NPP)-Gruppe ist durch das Verfahren der Zweiphotonen-Anregung spaltbar.^[146] Andere Verbindungen, wie zum Beispiel eine 3-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-butyl-(DMNPB)-Gruppe, die eine höhere Quantenausbeute, also eine größere Aufnahmekapazität an Photonen besitzen, wären allerdings geeigneter.^[147] Es bleibt zu klären, ob sich die in dieser Arbeit vorgestellte ABES mit NPP-Gruppe mit der Zweiphotonen-Technik in der Biomatrix spalten lässt. Der Einsatz anderer photo-spaltbarer Gruppen wie der DMNPB-Gruppe würde hingegen die Synthese des entsprechenden Phosphoramidits erfordern. Dies verdeutlicht die neuen Herausforderungen nicht nur im Bereich der Anwendungen chemisch modifizierter Aptamere, sondern auch der Synthese der alterierten Bausteine.

Die Thrombin-HD1-ABES könnte auch mit der TINA-modifizierten Version von HD1 hergestellt werden. Der Komplex wäre neben HD1-r8P auch mit HD1-22-r8P denkbar, dies würde durch die gesteigerte Affinität bessere Ausbeuten und eine Funktionalität der ABES in Gegenwart der Exosite II-bindenden Thrombin-Inhibitoren Antithrombin und Heparin Cofaktor II bedeuten.

Das Prinzip der ABES ist natürlich nicht nur auf den Thrombin-HD1-Komplex limitiert. Andere Protein-Aptamer-Paare sind denkbar. Mit der entsprechenden Funktionalisierung ausgestattet, sollte fast jedes Aptamer, das ein Protein bindet, an dieses koppelbar sein. Voraussetzung ist die Existenz und Zugänglichkeit von Lysin- oder Cystein-Resten, die mit dem *cross-linker* reagieren können. Da Aptamere gegen die unterschiedlichsten Zielproteine existieren,^[7] sind den Möglichkeiten der Anwendungen wenig Grenzen gesetzt. Die immer breiteren Applikationschancen der chemisch modifizierten Aptamere werden deren Durchbruch als Standardwerkzeug der Chemischen Biologie beschleunigen. So ist es durchaus möglich, dass sie im Methodenspektrum jedes molekularbiologischen oder klinischen Labors vertreten sein werden.

7. Methoden

7.1. Konzentrationsmessung von Oligonukleotiden und Proteinen

Die Konzentration der Oligonukleotide und Proteine, die in den Experimenten eingesetzt wurden, wurde nach der Messung der Extinktion in einem BioMate 3 UV-Vis Spektrophotometer ermittelt. Zunächst wurde eine Quarzküvette mit H₂O, dann mit 80 prozentigem Ethanol gewaschen und getrocknet. 100 µl des Puffers, in dem die Probe gelagert wurde, wurde in der Küvette als Leerwert vermessen und auf diese Weise das Photometer kalibriert. Danach wurde die Küvette mit 80 prozentigem Ethanol gewaschen, getrocknet, mit 100 µl Probe beladen und die Extinktion E gemessen. Über das Lambert-Beersche-Gesetz (Formel 1) konnte nun die Konzentration c der Probe in mol · l unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten der Probe ε in l · mol⁻¹ · cm⁻¹ und der Schichtdicke der Küvette d in cm, in Fall des BioMate 3 UV-Vis Spektrophotometers 1 cm, errechnet werden.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 1. Lambert-Beersches-Gesetz

Oligonukleotide wurden entsprechend ihres Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm vermessen. Für besonders kleine Volumina von Oligonukleotiden wurde der NanoQuant infinite 200 eingesetzt, bei dem nur 2 µl der Probe auf ein Quarzglasfenster gegeben wurden. Auch hier wurde das Gerät zunächst mit Puffer kalibriert und dann die Extinktion der Probe gemessen. Die Schichtdicke d betrug in diesem Fall 0,05 cm.

7.2. Radioaktive ³²P-Phosphorylierung

10 pmol Aptamer mit 5'-OH wurden mittels 20 Einheiten T4 Polynukleotid Kinase, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol und 300 µM γ-³²P-ATP in 70 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6 über 30 min bei 37 °C am 5'-Ende radioaktiv phosphoryliert. Die Probe wurde mittels Zentrifugation 2 min bei 750 g über eine illustra MicroSpin G-25 Säule aufgereinigt.

7.3. Analytisches PAGE Gel

Die am 5'-Ende radioaktiv markierte Oligonukleotid-Probe aus der oben beschriebenen Phosphorylierung wurde 1:100 verdünnt. 2 µl dieser Verdünnung wurden mit 18 µl 8 M Harnstoff, 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 0,001 % Bromphenolblau gemischt. Diese Mischung wurde auf ein 10 prozentiges Polyacrylamid (PAGE) Gel mit 8,3 M Harnstoff aufgetragen, das nach Tabelle 2 hergestellt wurde.

Chemikalie	Volumen [ml]
Rotiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid mit 8,3 M Harnstoff	20
8,3 M Harnstoff	25
10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0	5

Tabelle 2. Pipettierschema 10 prozentiges analytisches PAGE Gel

Die Gelelektrophorese wurde 45 min bei 25 V und 350 W in einem Laufpuffer mit 89 mM Tris HCl 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA pH 8,0 durchgeführt. Das radioaktive Signal wurde mittels einer fokussierten Phosphor Platte, die über Nacht auf dem Gel positioniert wurde, durch photo-stimulierte Lumineszenz (PSL) in einem FLA 3000 PhosphorImager ausgelesen. Die Intensität des radioaktiven Signals wurde mit der rayrest AIDA image analyzer Software ermittelt. Der Anteil von radioaktiv markiertem Aptamer in der Gesamtradioaktivität der Probe in relation zu nicht abgetrenntem γ -³²P-ATP wurde über Formel 2 errechnet und war gleichbedeutend mit dem Korrekturfaktor n für die Filterretention. PSL Signal Gel total repräsentiert den PSL Wert der gesamten Laufbahn der Probe, während PSL Signal Aptamer für den PSL Wert der Bande auf Laufhöhe des Aptamers steht.

$$n = \frac{\text{PSL Signal Aptamer}}{\text{PSL Signal Gel total}}$$

Formel 2. Berechnung des Korrekturfaktors n für die Filterretention

7.4. Filterretention

Verschiedene Zielproteinkonzentrationen (Tabelle 3) wurden in 100 µl 1x PBS pH 7,4 mit 1 nM ³²P-markierten Oligonukleotid, 1 mg/ml BSA, 1 µg/ml tRNA aus Hefe und 3 mM MgCl₂ für 30 min bei 37 °C in einer 96-well Platte inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Unterdruck, erzeugt durch eine an die Filterbindungsapparatur angeschlossene Wasserstrahlpumpe, durch eine 0,45 µm Nitrozellulose-Membran geleitet. Diese wurde drei Mal mit 200 µl 3 mM MgCl₂ in 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4 (Phosphatgepufferte Salzlösung, 1x PBS) gewaschen. Die Bindung von radioaktiv markiertem Aptamer an das Zielprotein wurde mittels einer fokussierten Phosphor Platte, die über Nacht auf der Membran positioniert wurde, durch photo-stimulierte Lumineszenz (PSL) in einem FLA 3000 PhosphorImager ausgelesen. Der Wert für die relative prozentuale Aptamer Bindung wurde mit der rayrest AIDA image analyzer Software ermittelt. Dazu wurde Formel 3 verwendet, PSL Signal Probe repräsentiert den PSL Wert des an das Zielprotein bindenden Aptamers, PSL Hintergrundsignal den PSL Wert einer Probe ohne Zielprotein, PSL Signal Filter total den maximalen PSL Wert und n den Korrekturfaktor für den Anteil von radioaktivem Aptamer im maximalen PSL Wert, ermittelt aus einem analytischen PAGE-Gel (Formel 2).

$$\text{Rel. Aptamer Bindung / \%} = 100 \cdot \frac{\text{PSL Signal Probe} - \text{PSL Hintergrundsignal}}{(\text{PSL Signal Filter total} - \text{PSL Hintergrundsignal}) \cdot n} \%$$

Formel 3. Berechnung der relativen prozentualen Aptamer Bindung

Alle Filterretentionsdaten wurden in Duplikaten gemessen, der angegebene Fehler ist der Standardfehler. Der Standardfehler ist definiert durch die Division der Standardabweichung σ durch die Wurzel der Anzahl der Messwerte N.

$$\text{Standardfehler} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Formel 4. Definition des Standardfehlers

Die Standardabweichung σ ist definiert als Wurzel der Varianz $\text{Var}(X)$.

$$\sigma = \sqrt{\text{Var}(X)}$$

Formel 5. Definition der Standardabweichung

Die Varianz ist wie folgt definiert,

$$\text{Var}(X) = \frac{\sum(x_i - \mu)^2}{N}$$

Formel 6. Definition der Varianz

wobei x_i = Messwert, μ = Mittelwert der Messwerte.

Der Standardfehler wurde mit der GraphPad Prism 5 Software errechnet.

Proteine beziehungsweise Kompetitoren wurden nach Tabelle 3 verwendet.

Abbildung	Protein/Kompetitor	Konzentrationen
8	Lysozym, Erk2 Cytohesin1Sec7 Domäne	1000; 500; 250; 125; 63; 31; 16; 0 μ M
10,11	Aprotinin	63; 20; 6,3; 2; 0,63; 0,2; 0,063; 0 μ M
10	Argatroban	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 0 μ M
14,15,33	Thrombin	1000; 500; 250; 125; 63; 31; 16; 8; 4; 2; 1; 0 μ M
18,29	Thrombin	64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 μ M
30	Thrombin	1000; 500; 250; 125; 63; 31; 16 μ M
54	Cytohesin1Sec7	2000; 1000; 500; 250; 125; 63; 31 μ M
57	Cytohesin1Sec7	1000; 500; 250; 125; 100; 63; 31; 16; 10 μ M

Tabelle 3. Konzentrationen Protein/Kompetitor in der Filterretention

Für alle dargestellten nicht-linearen Regressionen beziehungsweise K_d Bestimmungen wurde ein drei-Parameter-Fit, dargestellt in Formel 7, mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software errechnet, wobei B_{max} = Maximale Bindung; X = Proteinkonzentration; K_d = Dissoziationskonstante.

$$\text{Rel. Aptamer Bindung / \%} = \frac{B_{max} \cdot X}{(K_d + X)}$$

Formel 7. Drei-Parameter-Fit

7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie

Die untersuchten Oligonukleotide wurden in 1x PBS pH 7,4 für 1 min auf 95 °C erhitzt und über 30 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Spektren wurden mit einem Jasco J-810 Circular dichroismus Spektropolarimeter in einer Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke bei einer Temperatur von 20 °C aufgenommen. Mittels der Jasco CD Explorer Software wurden für die Messungen 1 nm Bandbreite, 1 nm Stufenhöhe und 0.5 s Zeit pro Messpunkt festgelegt. Die Spektren ergeben sich aus dem Mittelwert von 7 individuellen Messungen.

7.6. Schmelzpunktbestimmung für G-Quadruplex Oligonukleotide

Die temperaturabhängige Absorptionsänderung einer 10 μM Aptamer-Lösung in 1x PBS pH 7,4 bei dem Absorptionsmaximum für antiparallele G-Quadruplex-Strukturen von 295 nm wurde in einem Perkin-Elmer UV/Vis Spektrometer Lambda 2S mit einem Peltier-kontrollierten PTP-1 Thermostat-System und einer Quarzküvette mit einer optischen Wegstrecke von 1 cm gemessen. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Mit den Absorptionsdaten wurden die Mittelwerte der Duplikate errechnet und eine Absorptionsfunktion in Abhängigkeit der Temperatur von 25 bis 90 °C mit einer Heizrate von 0,5 °C/min erstellt. Von dieser wurde die 2. Ableitung bestimmt, $f''(x)=0$ errechnet um den Wendepunkt und damit die Schmelzpunkttemperatur T_m mit Hilfe der OriginLab Origin Pro 8 Software zu ermitteln.

7.7. Koagulationszeit

Um den Einfluss von Molekülen wie Aptameren auf das Gerinnungssystem quantifizieren zu können, sind Testmethoden in komplexen Matrizen wie humanem Plasma nötig. Die Ausbildung des Fibrin-Polymers im Plasma ist ein sehr plastischer und damit gut zu beobachtender Prozess. Da Thrombin und APC die Bildung des Fibrin-Gerinnsels direkt oder indirekt beeinflussen, ist eine Messung dieses Vorgangs ein verlässlicher Indikator für die Aktivität der Proteasen. Hier wurde die Zeit gemessen, die das Plasma benötigt, ein stabiles Fibrin-Gerinnsel auszubilden.

Die gerinnungshemmende Aktivität der Aptamere wurde mittels eines einstufigen plasmabasierten Koagulationszeittest in einem Amelung KC 10 A Kugel-Koagulometer gemessen. 75 nM humanes α -Thrombin wurde mit 250 nM Aptamer in 1x PBS, pH 7,4 mit 3 mM MgCl_2 und 1 mg/ml BSA zusammengegeben. 75 μl dieser Lösung wurden 4 min bei 37°C inkubiert und danach mit 75 μl humanem *pool*-Plasma, welches zuvor ebenfalls auf 37°C erwärmt wurde, in der Messküvette gemischt. Es wurde der Zeitpunkt gemessen, an dem die Kugel durch die Ausbildung der Fibrillen, welche durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin verursacht wurde, festgehalten wurde. Die Zeitspanne bis zu diesem Ereignis ergab die Koagulationszeit. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, angegeben ist der Standardfehler (siehe Formel 4).

7.8. Partielle Thromboplastinzeit

Die Messung wurde in einem automatisiertem BCS XP System durchgeführt. 50 μl humanes *pool*-Plasma wurde mit 3 μl 100 μM Aptamer in H_2O (unmodifiziert und TINA-modifiziert) versetzt und in der Messküvette mit 50 μl Dade Actin FSL aktiviertes PTT Reagenz gemischt. Nach 3 min Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$ wurden 50 μl 25 mM CaCl_2 hinzugegeben und die Koagulationszeit gemessen. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, angegeben ist der Standardfehler (siehe Formel 4).

7.9. Ausbildung des Komplexes aus ABES und Thrombin

6,25 nmol Aptamer funktionalisiert mit photo-spaltbarem Verknüpfers wurden mit 200 nmol Sulfo-[Ethylen Glycolbis(Succinimidylsuccinat)] (sulfo-EGS) in 33 mM Hydrogencarbonat-Puffer pH 8,2 mit 30 %Vol. Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Illustra MicroSpin G-25 Säulen wurden mit 50 μl 1x PBS pH 7,4 vorgewaschen und zur Probenaufreinigung mittels Zentrifugation bei 750 g für 2 min verwendet. Eine Micro Bio-Spin P-6 Gel Säule wurde mit 500 μl 1xPBS pH 7,4 vorgewaschen und zur Aufreinigung von humanem Thrombin mittels Zentrifugation bei 1000 g für 4 min eingesetzt. 50 pmol aufgereinigtes Thrombin wurden mit der funktionalisierten Aptamer-Probe, 40 μM kompetitierendem Aptamer bzw der angegebenen Konzentration in den Kompetitions-Experimenten in 100 μl 1x PBS pH 7,4 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der *cross-link* mit einer mit 500 μl 1x PBS pH 7,4 vorgewaschenen Micro Bio-Spin P-30 Gel Säule mittels Zentrifugation bei 1000 g für 4 min aufgereinigt.

7.10. Amidolytische Aktivität von Thrombin

Die amidolytische Aktivität des *cross-links* wurde in einem Fluoreszenz-Test im 96-*well* Format mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Eine Standard Kurve von 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nativem humanem Thrombin in 1x PBS pH 7,4 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA wurde hergestellt. Die *cross-link* Proben wurden 1:50 verdünnt, 50 μl dieser Verdünnungen und der Standard Kurve wurden in einem *well* einer schwarzen 96-*well* Platte mit Flachboden mit 50 μl 2 μM fluorogenem Peptid-Substrat I-1140 (Z-Gly-Gly-Arg-AMC \cdot HCl) in 1x PBS pH 7,4 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA gemischt. Die Fluoreszenzemission bei 460 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm wurde für 30 min in einem Synergy 2 Plattenlesegerät gemessen. Über die Standard Kurve wurde die amidolytische Aktivität der *cross-link* Proben errechnet. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, angegeben ist der Standardfehler (siehe Formel 4).

7.11. Plasma-Gerinnungstest

Die Ausbildung des Fibrin-Gerinnsels kann nicht nur durch die Koagulationszeit, sondern auch direkt durch die Absorptionsänderung des Plasmas gemessen werden. Humanes *pool* Plasma wurde auf 37°C erwärmt. Eine Standardkurve von 0,03 bis 2 µg/ml humanem Thrombin in 1x PBS pH 7,4 mit 1 mg/ml BSA wurde vorbereitet. 50 µl der Proben der Standardkurve sowie 50 µl der bestrahlten und unbestrahlten *cross-link* Probe, eingestellt auf 0,25 µg/ml amidolytisch aktivem Thrombin *cross-link* (siehe 7.10. Amidolytische Aktivität von Thrombin), wurden mit 50 µl erwärmtem humanem *pool* Plasma in einer transparenten 96-*well* Platte mit Rundboden gemischt. Es wurde die Absorption bei 360 nm für 20 min in einem Synergy 2 Plattenlesegerät gemessen. Die Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt, angegeben ist die Standardabweichung (siehe Formel 5).

7.12. Hirudin Testsystem

25 µl 1 µg/ml amidolytisch aktiver Thrombin *cross-link*, 3 min mit dem UV-Bestrahlungsgerät bestrahlt beziehungsweise unbestrahlt, wurden mit 50 µl 2 µM fluorogenem Peptid-Substrat I-1140 und 25 µl 2 µg/ml beziehungsweise 4 µg/ml Hirudin in 1x PBS pH 7,4 mit 1 mg/ml BSA in einer schwarzen 96-*well* Platte mit Flachboden gemischt. Die Fluoreszenzemission bei 460 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm wurde für 30 min in einem Synergy 2 Plattenlesegerät gemessen. Die Steigung des Fluoreszenzwertes wurde durch lineare Regression mittels der GraphPad Prism 5 Software errechnet. Die Steigungswerte wurden als Prozent der Steigung für freies Thrombin ohne Hirudin und ohne UV-Bestrahlung angegeben. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, angegeben ist der Standardfehler (siehe Formel 4).

7.13. Western Blot

1 µg/ml amidolytisch aktiver Thrombin *cross-link* (hergestellt nach 7.9. Ausbildung des Komplexes aus ABES und Thrombin, quantifiziert nach 7.10. Amidolytische Aktivität von Thrombin) wurden in 1 x Lämmli-Puffer bestehend aus 62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 % Glycerin, 5 % 2-Mercaptoethanol und 0,001 % Bromphenolblau gemischt. Die Proben wurden zur Proteindenaturierung für 5 min bei 95 °C erhitzt, über 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt und auf ein 10 prozentiges SDS-Polyacrylamid (PAGE) Gel (375 mM Tris HCl pH 8,8 und 3,5 mM SDS) mit einem 4 prozentigem Sammelgel (125 mM Tris HCl pH 6,8 und 3,5 mM SDS), hergestellt nach Tabelle 4, aufgetragen.

Gelelektrophorese wurde für 45 min bei 150 V in einem Laufpuffer mit 25 mM Tris (pH nicht eingestellt), 200 mM Glyzin, und 3,5 mM SDS in einem Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese System durchgeführt. Die Proben wurden

mittels eines Nass-Blotes bei 300 mA über 1,5 h auf eine 0,45 µm Nitrozellulose-Membran übertragen, welche anschließend 30 min mit 5 % BSA in TBST-Puffer (20 mM Tris HCl pH 7,6, 137 mM NaCl und 0,1 % Tween-20) geblockt wurde. Danach wurde die Membran 16 h bei 4 °C mit primärem Schaf Anti-humanes Thrombin Antikörper, 1:2000 in TBST-Puffer verdünnt, inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit TBST-Puffer gewaschen und 1,5 h mit IRDye 800CW Esel Anti-Ziege IgG (H+L) Sekundärantikörper, welcher eine Kreuzaktivität für Schaf besitzt, 1:2000 mit 5 % BSA in TBST-Puffer verdünnt, inkubiert. Nach drei Mal waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran mit einem Odyssey Scanner bei 800 nm ausgelesen. Die Bandenintensität wurde mit der Bio-Rad Quantity One Software analysiert. Für die Quantifizierung der Bandenintensität wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, angegeben ist der Standardfehler (siehe Formel 4).

Reagenz	10 % Trenngel [µl]	4 % Sammelgel [µl]
Rotiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	1667	213
H ₂ O	2045	975
4x Trenngel Puffer 1,5 M Tris HCl, 14 mM SDS, pH 8,8	1250	-
4x Sammelgel Puffer 500 mM Tris HCl; 14 mM SDS; pH 6,8	-	400
Tetramethylethyldiamin	8	2
Ammoniumperoxodisulfat 10 % in H ₂ O	30	10,4

Tabelle 4. Pipettierschema 10 prozentiges SDS-PAGE Gel mit 4 prozentigem Sammelgel

7.14. Bead-Aufreinigung

400 µl gut durchmischte *Dynabeads* M280 mit Streptavidinoberfläche wurden mittels eines DynaMag-2 Magneten in einem Eppendorfgefäß immobilisiert und drei Mal mit 100 µl 2x B&W Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 2 M NaCl) nach Herstelleranweisung gewaschen und in 400 µl 1x B&W Puffer (5 mM Tris HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA und 1 M NaCl) aufgenommen. 200 µl der gewaschenen *beads* wurden mit 200 µl 2 µM 3'-biotinyliertem HD1 (HD1-bio) gemischt und für 15 min inkubiert. Die 200 µl HD1-bio beschichteten sowie die unbeschichteten *beads* wurden drei Mal mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen und in 200 µl 1x PBS pH 7,4 aufgenommen. Die Flüssigkeit über den *beads* wurde abgenommen. Die Reaktionsgemische der *cross-link*-Ausbildung (7.9. Ausbildung des Komplexes aus ABES und Thrombin) wurden auf die *beads* gegeben und 20 min mit vorsichtigem vortexen alle 5 min inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden abgenommen, die *beads* in 200 µl 1x

PBS pH 7,4 aufgenommen. Die Reaktionsgemische und *beads*-Lösungen wurden per Western blot analysiert (7.13. Western blot).

7.15. Mikroskopie von Fibrillenbildung

Für die Echtzeitaufnahmen der Gerinnung mittels Durchlichtmikroskopie wurden rechteckige Glasröhren (0,03 x 0,3 x 50 mm) mit 1x PBS pH 7,4, 1 mg/ml BSA, 8 mg/ml Fibrinogen und 0,1 µg/ml amidolytisch aktiver Thrombin *cross-link* befüllt. Die Aufnahmen wurden mittels eines Carl Zeiss Axioobserver.Z1, einem A-Plan 10x/0.25 Ph1 (a = 4.4mm) Objektiv, einem Carl Zeiss dichroitischen Filterset 02 und einer MRm AxioCam erstellt. Für die UV-Bestrahlung wurde eine Rapp UVICO 120 W Hg Lampe und ein Carl Zeiss Fluor 10x/0.50 Objektiv eingesetzt. Bilder und Filmaufnahmen wurden mit der Carl Zeiss Zen 2012 blue edition Software bearbeitet.

7.16. Zellkultur von Ramos-Zellen

Ramos-Zellen, B-lymphoblastoide Suspensionszellen aus einem humanem Burkitt-Lymphom, wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) in einer Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² mit VENT-Verschluss im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für alle folgenden Pipettierschritte wurden serologische Pipetten verwendet. Alle 48 h wurden unter der Sterilbank zwei Drittel des Volumens der Zellsuspension abgenommen und für Experimente genutzt oder mit 3 % Kohrsolin denaturiert und verworfen. Die entnommene Zellsuspension wurde durch dasselbe Volumen RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS ersetzt.

7.17. Affinitätsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Aptameren an Ramos-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Für die Affinitätsbestimmung von Aptameren an Ramos-Zellen in direkten Bindungs- und in Konkurrenzexperimenten wurden zunächst die Aptamere entsprechend der benötigten Konzentrationen gemischt und in H₂O verdünnt. Die Aptamer-Verdünnungen wurden 2:1 mit RPMI-1640 Medium (ohne FCS) gemischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und über 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Konzentration der Ramos-Zellsuspension wurde mittels einer Neubauer Zählkammer in einem Axiovert 25 Mikroskop ermittelt. 200.000 Zellen pro 100 µl wurden 5 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und durch dieselbe Menge RPMI-1640 Medium (ohne FCS) ersetzt. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren resuspendiert und je 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Aptamer-Verdünnung mit 33 % RPMI-1640 Medium in einem 5 ml Durchflusszytometer-Röhrchen (12 mm x 75 mm) gemischt und 30 min im

Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert. Danach wurden 2 ml 1x *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) in die Durchflusszytometer-Röhrchen gegeben und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, weitere 2 ml 1x HBSS wurden in die Röhrchen gegeben und wieder 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals dekantiert und verworfen. Es wurden 100 µl 1x HBSS in die Röhrchen geben, diese wurden gevortext und im Durchflusszytometer vermessen. Bei allen Messungen wurden Vorwärtsstreulicht-Detektor-Spannung bei 209 V und Seitwärtsstreulicht-Detektor-Spannung bei 335 V gewählt. Zur Analyse der Bindung von 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) markierten Aptameren wurde der Fluorescein-Kanal mit einem Argon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emmisionsdetektor mit einem Filter von 515-545 nm, welcher in Kapitel 4.3.9., Fluoreszenz-markierter Bindungstests von C10.36, mit der entsprechend angegebenen Spannung und in allen weiteren Experimenten mit einer Spannung von 346 V betrieben wurde, verwendet. Um die Kompetitionsfähigkeit der modifizierten C10.36 Varianten zu ermitteln, wurde die Bindung von C10.36-Atto-647 an die Zellen mittels des Allophycocyanin-Kanals mit einem Helium-Neon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem Emmisionsdetektor mit einem Filter von 650-670 nm, welcher mit einer Spannung von 525 V betrieben wurde, gemessen. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Proben wurde mit der Tree Star FlowJo Software ermittelt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, angegeben ist die Standardabweichung (siehe Formel 5).

7.18. Zellkultur von Michigan Cancer Foundation-7-Zellen

Die adhärenente humane Brustkrebszelllinie *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF7) wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) in einer Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² mit VENT-Verschluss im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für alle folgenden Pipettierschritte wurden serologische Pipetten verwendet. Bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen, was ca. alle 48 h eintrat, wurde unter der Sterilbank das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml 1x Dulbeccos Phosphatgepufferter Salzlösung pH 7,2 (DPBS, steril) gewaschen. Danach wurden 2 ml 1x Trypsin-EDTA (14,6 mM NaCl, 480 µM EDTA, 21 µM Trypsin, steril) auf den Zellrasen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und 5 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Gegebenenfalls wurde die Ablösung der Zellen durch vorsichtiges Klopfen auf die Unterseite der Zellkulturflasche unterstützt. Sobald alle Zellen gelöst waren, wurden 8 ml DMEM mit 10 % FCS hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen. Ein Zehntel des Kultivierungsvolumens wurde in der Zellkulturflasche belassen und mit DMEM mit 10 % FCS aufgefüllt, die übrige Zellsuspension wurde für Experimente genutzt oder mit 3 % Kohrsolin denaturiert und verworfen.

7.19. Zellviabilitätstest

Für alle folgenden Pipettierschritte wurden serologische Pipetten verwendet. Die Konzentration der MCF7-Zellsuspension in DMEM mit 10 % FCS wurde mittels einer Neubauer Zählkammer in einem Axiovert 25 Mikroskop ermittelt. 3000 Zellen in 100 µl Medium wurden unter der Sterilbank in eine transparente 96-well Platte mit Flachboden (steril) gegeben und 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert. Die Aptamere wurden in der finalen Konzentration mit Lipofectamin LTX nach Herstellerangaben gemischt. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 100 µl Aptamer-Lipofectamin-Lösung auf die Zellen gegeben. Es wurde 72 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert, danach wurden 15 µl 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in DPBS (steril) pH 7,2 zu dem Medium gegeben, das von lebendigen Zellen durch Reduktase-Aktivität zu einem Formazan umgewandelt wird, welches mittels Absorption quantifiziert werden kann.^[148] Nach weiteren 4 h im Inkubator wurden 100 µl Lyse-Puffer (siehe Tabelle 5) in die wells gegeben. Die Platte wurde 1 h bei 300 rpm geschüttelt und danach wurde die Absorption bei 570 nm in einem Varioskan Plattenlesegerät gemessen. Es wurden sechs unabhängige Experimente mit Quadruplikaten durchgeführt, angegeben ist die Standardabweichung (siehe Formel 5).

Chemikalie	Menge
Dimethylformamid	250 ml
H ₂ O	250 ml
Natriumdodecylsulfat	100 g
Essigsäure 100%	10 ml

Tabelle 5. Lyse-Puffer-Zusammensetzung Zellviabilitätstest. pH ~ 4,7

7.20. Zellkultur von HeLa-Zellen in glukosefreiem Medium

In die adhärenente humane Zelllinie HeLa aus den Epithelzellen eines Zervixkarzinoms wurden in vorherigen Studien ein Konstrukt mit dem Glukosamin-6-Phosphat-Synthetase(glmS)-Ribozym aus *Bacillus subtilis* in der 3'-UTR der mRNS des *enhanced* grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) stabil transfiziert (glmS-eGFP-HeLa-Zellen).^[149] Da Hexosen wie Glukose das glmS-Ribozym inhibieren können,^[150] wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 0,8 mg/ml Geneticin in einer Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² mit VENT-Verschluss im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für alle folgenden Pipettierschritte wurden serologische Pipetten verwendet. Bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen, was ca. alle 72 h bedeutete, wurde unter der Sterilbank das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml 1x Dulbeccos

Phosphatgepufferter Salzlösung pH 7,2 (DPBS, steril) gewaschen. Danach wurden 2 ml 1x Trypsin-EDTA (14,6 mM NaCl, 480 µM EDTA, 21 µM Trypsin, steril) auf den Zellrasen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und 5 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Gegebenenfalls wurde die Ablösung der Zellen durch vorsichtiges Klopfen auf die Unterseite der Zellkulturflasche unterstützt. Sobald alle Zellen gelöst waren, wurden 8 ml RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % FCS hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen. Ein Zehntel des Kultivierungsvolumens wurde in der Zellkulturflasche belassen und mit RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % FCS und 0,8 mg/ml Geneticin aufgefüllt, die übrige Zellsuspension wurde für Experimente genutzt oder mit 3 % Kohrsolin denaturiert und verworfen.

7.21. Durchflusszytometrie von glmS-eGFP HeLa-Zellen

Die Konzentration der glmS-eGFP-HeLa-Zellen RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % FCS und 0,8 mg/ml Geneticin wurde mittels einer Neubauer Zählkammer in einem Axiovert 25 Mikroskop ermittelt. 800.000 Zellen in 1 ml RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % FCS und 0,8 mg/ml Geneticin wurden in ein well einer 24-well Platte (steril) gegen und für 24 h kultiviert. Glukosamin-6-Phosphat mit photo-labiler Schutzgruppe und Acetopropyl-Schutzgruppen wurde in 100 % DMSO aufgenommen. Für Inositol-1,4,5-Trisphosphat wurde bereits gezeigt, dass durch die Einführung von Acetoxymethylester-Schutzgruppen das Signalmolekül eine Zellmembranpermeabilität erreicht. Es wurde nachgewiesen, dass diese Schutzgruppen durch Esterasen innerhalb der Zelle abgespalten werden und somit das Zielmolekül entschützt wird.^[151] Dieser Ansatz sollte nun auf das Glukosamin-6-Phosphat mit photo-labiler Schutzgruppe und in diesem Fall Acetopropylester-Schutzgruppen (GluN6P-*caged*) übertragen werden. Um einen Effekt des Moleküls auf das glmS-Ribozym messen zu können, wurde in einer UV-LED-Kammer ($\lambda = 365$ nm) vor Inkubation mit den Zellen für 5 min bestrahlt, damit entstand GluN6P-*uncaged*. Von den Hexosen GluN6P-*caged*, GluN6P-*uncaged* und Glukosamin (GluN) wurden 100 mikromolare Lösungen in RPMI-1640 Medium ohne Glukose ohne FCS mit 0,2 % DMSO, 0,02 Pluronic F-127 zur Verbesserung der Löslichkeit hergestellt. Das Medium der Zellen in der 24-well Platte wurde unter der Sterilbank mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml 1x Dulbeccos Phosphatgepufferter Salzlösung pH 7,2 (DPBS, steril) gewaschen. Danach wurde jeweils 1 ml der Hexose-Lösungen auf die Zellen gegeben. Es wurde 2 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert, abgesaugt und 1 ml RPMI-1640 Medium ohne Glukose mit 10 % FCS und 0,8 mg/ml Geneticin auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde weitere 72 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert. Das Medium wurde wieder mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 500 µl 1x DBPS pH 7,2 (steril) gewaschen. Es wurden 100 µl 1x Trypsin-EDTA (14,6 mM NaCl, 480 µM EDTA, 21 µM Trypsin, steril) zu den Zellen gegeben und im

Inkubator 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Athmosphäre inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Verdünnung mit 400 µl 1x DBPS pH 7,2 (steril) gestoppt und die Zellsuspension in Durchflusszytometerröhrchen überführt. Diese wurden gevortext und im Durchflusszytometer vermessen. Bei allen Messungen wurden Vorwärtsstreulicht-Detektor-Spannung bei 100 V und Seitwärtsstreulicht-Detektor-Spannung bei 335 V gewählt. Zur Analyse der Fluoreszenz des in den Zellen exprimierten eGFP wurde der Fluorescein-Kanal mit einem Argon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsdetektor mit einem Filter von 515-545 nm, welcher mit einer Spannung von 300 V betrieben wurde, verwendet. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Proben wurde mit der Tree Star FlowJo Software ermittelt. Die Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt, angegeben ist die Standardabweichung (siehe Formel 5).

7.22. Pfu-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNS Templaten für RNS Aptamere wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Es wurde die thermostabile DNS-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, welche eine Korrekturlesefunktion besitzt, wodurch nur eine Fehlpaarung in 1 x 10⁶ Basen entsteht.^[152] Die Reagenzien wurden nach der folgenden Tabelle 6 für ein Totalvolumen von 100 µl eingesetzt.

Reagenz	Vorrats-Konzentration	End-Konzentration	Menge [µl]
Pfu-PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgSO ₄ ; 1 mM Triton X-100; 1 mg/ml BSA	10x	1x	10
dNTP Mix: dATP; dGTP; dTTP; dCTP;	25 mM	250 µM	1
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	10
3'-Primer	100 µM	1 µM	1
5'Primer	100 µM	1 µM	1
Pfu-DNS- Polymerase	2 U/µl	0,02 U/µl	1
DNS-Templat	4 µM	40 nM	1
H ₂ O			75

Tabelle 6. Pipettierschema Pfu-PCR.

Die PCR wurde mit 10 Zyklen in einem Eppendorf Gradient PCR Mastercycler 384 mit den in der folgenden Tabelle 7 dargestellten Einstellungen durchgeführt.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	95	60
Anlagerung	60	60
Verlängerung	72	90
Deckel	110	

Tabelle 7. Bedingungen für die Zyklen der Pfu-PCR.

7.23. *In vitro* Transkription von Aptameren

Die DNS-Template der eingesetzten Aptamere besaßen eine T7-Promotorregion. Die RNS-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 erkennt diese Region und beginnt die Transkription mit der Sequenz GGGAGA.^[153] Da die bei der Strangverlängerung entstehenden Pyrophosphate die Aktivität der Polymerase stören können, wurde Anorganische Pyrophosphatase in die Reaktionsmischung gegeben. Die Hydrolyse der Pyrophosphate zu Orthophosphaten begünstigt das Reaktionsgleichgewicht der Polymerase. RNasin ist ein rekombinantes Protein aus *Escherichia coli* und wurde zur Ribonukleasen-Inhibition eingesetzt. Die Transkription wurde wie in Tabelle 8 angegeben angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wurde eine radioaktive Transkription durchgeführt, wurde zusätzlich 1 µl 300 µM α -³²P-GTP hinzugegeben und nur 45 min bei 37 °C inkubiert.

Reagenz	Vorrats-Konzentration	End-Konzentration	Menge [µl]
Tris HCl pH 7,9	200 mM	40 mM	20
MgCl ₂	100 mM	25 mM	25
DTT	100 mM	5 mM	5
NTP-Mix: ATP; GTP; UTP; CTP;	25 mM	2,5 mM	10
RNasin	4 U/µl	0,04 U/µl	1
Anorganische Pyrophosphatase	2 U/µl	0,02 U/µl	1
DNS-Templat	5 µM	25 nM	5
T7-RNS-Polymerase	50 U/µl	2,5 U/µl	5
H ₂ O			28

Tabelle 8. Pipettierschema *in vitro* Transkription.

Nach der Transkription wurde 0,5 µl 5 U/µl Desoxyribonuklease I pro 100 µl Transkription hinzugeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert, um das DNS-Templat abzubauen. Im Folgenden wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (siehe 7.25. Phenol-Chloroform Extraktion). Im Falle der radioaktiven Transkription mit α -³²P-GTP wurde nach der Transkription kein Desoxyribonuklease-Verdau durchgeführt, sondern die Probe mittels Zentrifugation 2 min bei 750 g über eine illustra MicroSpin G-25 Säule aufgereinigt und direkt in der Filterretention (siehe 7.4. Filterretention) eingesetzt.

7.24. RNS-Ligation

Die RNS-Fragmente von dem Aptamer M69 wurden mit Hilfe der T4 RNS und T4 DNS Ligase unter Verwendung einer DNS-Schiene zu dem Volllänge-Aptamer zusammengesetzt. Die Fragmente hatten an der Ligationsstelle am 3'-Ende eine unmodifizierte Hydroxylgruppe und am 5'-Ende eine Monophosphatgruppe. Um inkorrekte Ligationen zu vermeiden, trug das nicht an der Ligation beteiligte 3'-Ende ebenfalls eine Monophosphatgruppe. Es wurde eine Ligation mit komplett gepaarten, stumpfen Enden (45_46 Ligation) sowie eine Ligation mit ungepaarten Donor- und Akzeptorenden (37_38 Ligation) durchgeführt. 4 nmol der RNS-Fragmente und 4 nmol der DNS-Schiene wurden in 297 µl H₂O gelöst und 3 min auf 95 °C erhitzt. Die Probe wurde über 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt und mit sowohl 40 µl 50 mM Tris HCl pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP und 10 mM Dithiothreitol als auch 40 µl Polyethylenglycol 4000 gemischt. 0,25 µl 400 U/µl DNS Ligase und 19,75 µl H₂O wurden hinzugegeben und für 2 h bei 33 °C inkubiert. Danach wurden 3 µl 10 U/µl RNS Ligase hinzugefügt und 2,5 h bei 33 °C inkubiert. Zur Aufreinigung wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (siehe 7.25. Phenol-Chloroform Extraktion).

7.25. Phenol-Chloroform Extraktion

Um die Proteine aus der *in vitro* Transkription beziehungsweise der RNS-Ligation von den Oligonukleotiden abzutrennen, wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Es wurde die Probe 1:1 mit Phenol gemischt und gevortext. Danach wurde für 3 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand (wässrige Phase) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu dem Überstand wurde das dreifache Volumen an Chloroform geben und gevortext, anschließend wieder 3 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand (wässrige Phase) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Zur Fällung der Oligonukleotide wurden ein Zehntel des Probenvolumens 3 M Natriumacetat pH 5,4 und das dreifache Probenvolumen Ethanol absolut zu dem Überstand hinzugegeben. Die Mischung wurde für 20 min auf -80 °C gelagert und anschließend 20 min bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand mit 50 µl 70 prozentigem Ethanol

gewaschen. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur und 20.000 g zentrifugiert und der Rückstand in einem Cencrator 5301 bis zur Trockne eingengt. Die somit aufgereinigten Oligonukleotide wurden im gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

7.26. Trennung von RNS-Strängen mittels Ionenaustausch-HPLC

Die in der RNS-Ligation hergestellten M69-Volllänge-Moleküle mussten von den nicht ligierten RNS-Fragmenten und der DNS-Schiene abgetrennt werden. Hierfür wurde Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (IE-HPLC) mit einem Agilent 1200 HPLC System und einer DNAPAC PA100 (4 x 250 mm) bei 80 °C angewendet. Die Proben wurden nach Ligation und Phenol-Chloroform Extraktion in 50 µl H₂O aufgenommen. Diese wurden in die HPLC injiziert und mit dem Programm in Tabelle 9 getrennt.

Zeit [min]	Lösung A 25 mM Tris HCl pH 8,0 [%]	Lösung B 25 mM Tris HCl pH 8,0; 5 M NaClO ₄ [%]
0	100	0
45	40	60
50	40	60
55	100	0
60	100	0

Tabelle 9. Programm IE-HPLC

8. Materialien

8.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0.5 % Trypsin-EDTA (10x, steril)	Life technologies
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich
α - ³² P-GTP	PerkinElmer
γ - ³² P-ATP	PerkinElmer
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Anorganische Pyrophosphatase	New England BioLabs
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Dade Actin FSL aktiviertes PTT Reagenz	Siemens
Desoxyribonuklease I	New England BioLabs
Dimethylformamid	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth
Dithiothreitol	Carl Roth
Dulbeccos Phosphatgepufferter Salzlösung (steril), kein Ca, kein Mg, Gibco	Life technologies
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose, Pyruvate, Gibco	Life technologies
Dynabeads M280 Streptavidin	Life technologies
Essigsäure 100 %	Merck Millipore
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Merck
Fluorogenes Peptid-Substrat I-1140	Bachem
Fötale Kälberserum HyCloneR	Thermo Scientific
Geneticin (G418 Sulfate), 50 mg/ml (steril)	Life technologies
Glycin	Carl Roth
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Gibco	Life technologies
Harnstoff	Carl Roth
IRDye 800CW Esel Anti-Ziege IgG (H+L) Sekundärantikörper	Li-cor Biotechnology
Kaliumchlorid	Carl Roth

Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kohrsolin FF	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth
PageRuler Plus Prestained Protein Leiter	Thermo Scientific
Pfu-DNS-Polymerase	New England BioLabs
Phenol	Carl Roth
Pluronic F-127	Invitrogen
Polyethylenglycol 4000	Sigma-Aldrich
Primärer Schaf Anti-humanes Thrombin Antikörper	Haematologic Technologies Inc.
RNasin	Promega
Rotiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth
RPMI-1640 Medium, Gibco	Life technologies
RPMI-1640 Medium ohne Glukose	PAN-Biotech
Sulfo-EGS	Thermo Scientific
T7 RNS-Polymerase	Promega
T4 DNS Ligase	New England BioLabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England BioLabs
T4 RNS Ligase	New England BioLabs
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Tween-20	Carl Roth

Alle Oligonukleotide, die nicht von Kooperationspartnern synthetisiert wurden, wurden von der Microsynth AG hergestellt.

8.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-well Platte mit Flachboden, transparent (steril)	TPP
96-well Platte mit Flachboden, schwarz	TPP
96-well Platte mit Rundboden, transparent	TPP
96-well Platte mit Flachboden, weiß	TPP
96-well Platte mit Flachboden, transparent (steril)	TPP
Durchflusszytometer-Röhrchen (12 mm x 75 mm)	BD Biosciences
Glasröhren (0,03 x 0,3 x 50 mm)	Vitrocom
Illustra MicroSpin G-25 Säulen	GE Healthcare Life Sciences
Micro Bio-Spin P-6 Gel Säule, SSC Puffer	Bio-Rad
Micro Bio-Spin P-30 Gel Säule, Tris Puffer	Bio-Rad
Nitrozellulose-Membran 0,45 µm	Whatman
Pasteurpipette	Carl Roth
Serologische Pipette 5 ml	TPP
Serologische Pipette 10 ml	TPP
Serologische Pipette 25 ml	TPP
Zellkulturflasche Wachstumsfläche 75 cm ² VENT	TPP

8.3. Geräte

Gerät	Hersteller
1200 Serie HPLC System	Agilent
Automatisiertes BCS XP System	Siemens Healthcare Diagnostics
Axioobserver.Z1	Carl Zeiss
Axiovert 25	Carl Zeiss
BioMate 3 UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Scientific
Centrator 5301	Eppendorf
DNAPac PA100 (4 x 250 mm)	Dionex
DynaMag-2 Magnet	Life technologies
FACSCanto II	BD Biosciences
FLA 3000 PhosphorImager	Fujifilm
Gradient PCR Mastercycler 384	Eppendorf
Inkubator Hera Cell	Heraeus
J-810 Circular dichroismus Spektropolarimeter	Jasco
KC 10 A Kugel-Koagulometer	Amelung
Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese System	Bio-Rad
NanoQuant infinite 200	Tecan
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Odyssey scanner	Li-cor Biotechnology
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Synergy 2 Plattenlesegerät	BioTek
UVP 3UV Lampe	Thermo Scientific
UV-Bestrahlungsgerät mit 3 UV-LEDs NCCU033 365 nm 130 mW	Elektrowerkstatt Chemische Institute Universität Bonn
UV/Vis Spektrometer Lambda 2S	Perkin-Elmer
Varioskan Plattenlesegerät	Thermo Scientific

9. Anhang

9.1. C10.36-TINA zusätzliche Daten

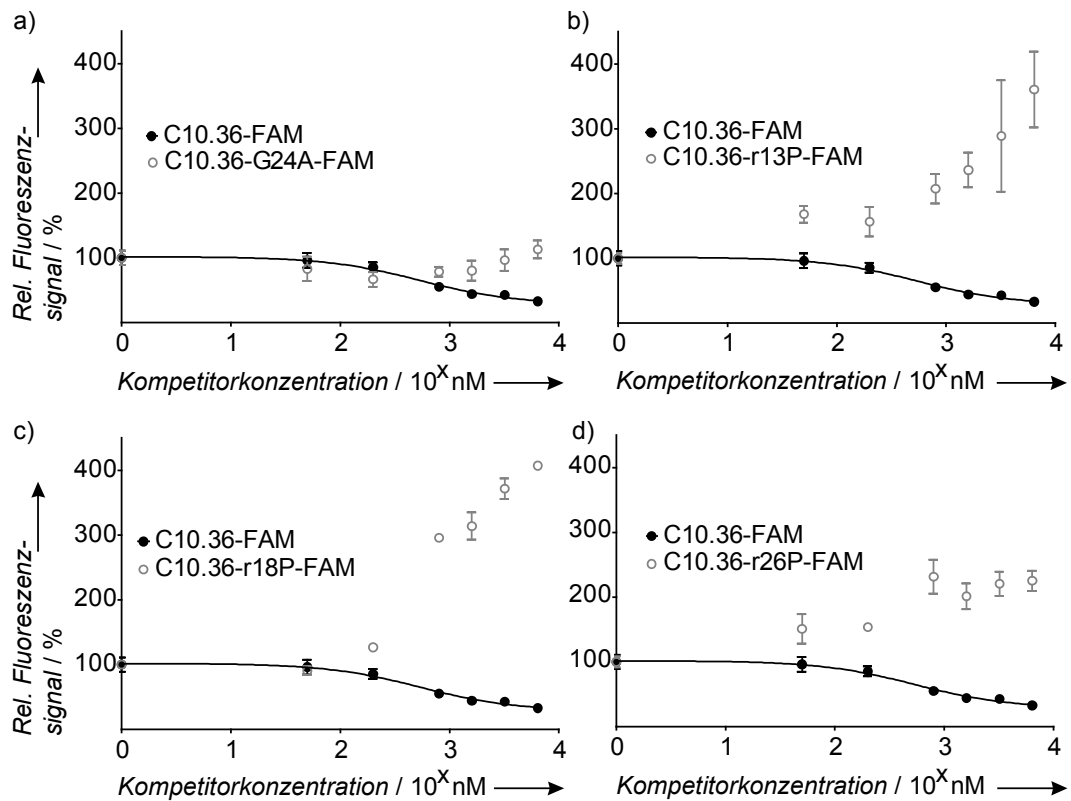


Abbildung 44. Koinkubation mit einigen C10.36-TINA-Modifikationen erhöht das Fluoreszenzsignal des Wildtyp-Aptamers. Wettbewerbsverhalten von C10.36-TINA-Modifikationen gegenüber Wildtyp-C10.36. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung nach 30 min Inkubation mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Kompetitor mit FAM-Markierung. Die Werte wurden auf das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36 mit Atto-647-Markierung ohne Kompetitor normalisiert. Diese hier dargestellten C10.36-TINA-Modifikationen steigern aus unbekanntem Gründen die Bindung und/oder die Aufnahme von Wildtyp-C10.36 mit Atto-647-Markierung.

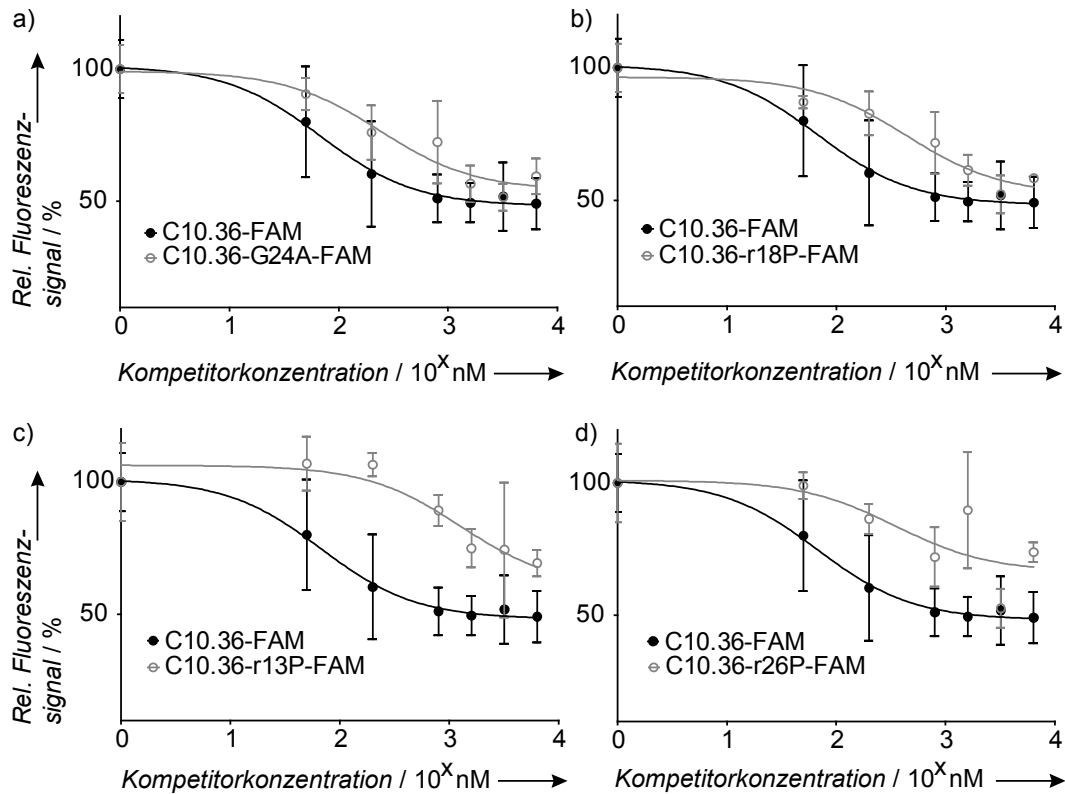


Abbildung 45. Das Fluoreszenzsignal von C10.36-G24A wird durch C10.36-TINA Modifikationen nicht erhöht. Wettbewerbsverhalten von C10.36-TINA-Modifikationen gegenüber C10.36-G24A. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36-G24A mit Atto-647-Markierung nach 30 min Inkubation mit Ramos-Zellen im Durchflusszytometer in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Kompetitor mit FAM-Markierung. Die Werte wurden auf das Fluoreszenzsignal von 100 nM C10.36-G24A mit Atto-647-Markierung ohne Kompetitor normalisiert. Diese hier dargestellten C10.36-TINA-Modifikationen zeigen bei Koinkubation mit C10.36-G24A mit Atto-647-Markierung nicht den Effekt der Signalerhöhung, welcher sich bei Wildtyp-C10.36 zeigt (Abbildung 44).

9.2. HD22 LNS zusätzliche Daten

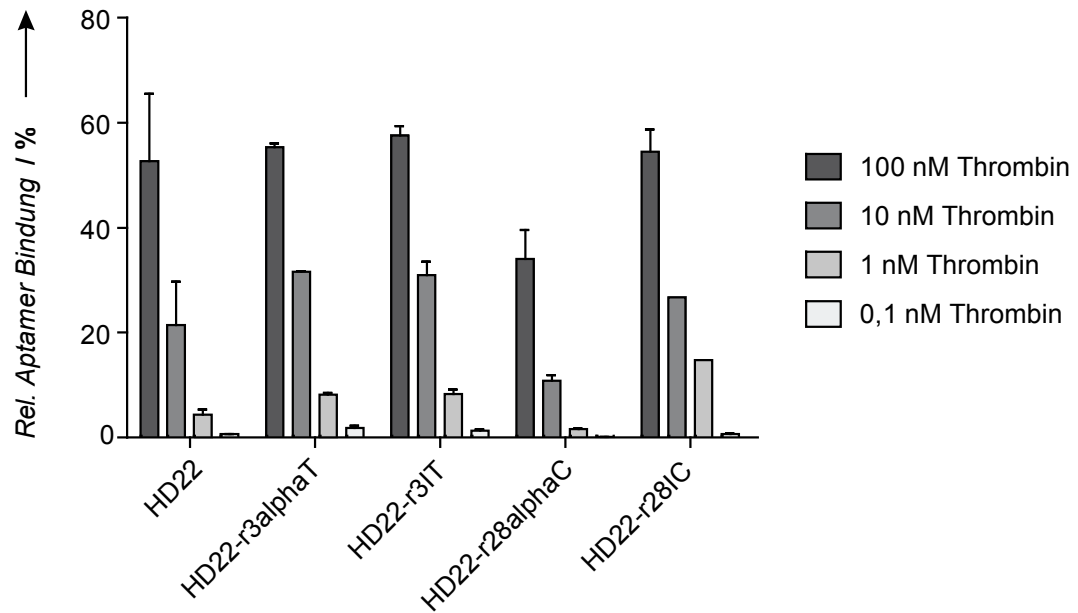


Abbildung 46. HD22-r28alphaC hat eine niedrigere Affinität an Thrombin als das Wildtyp-Aptamer. Bindung von HD22 und HD22-LNS-Modifikationen im Filterretentionstest mit Thrombin-Konzentrationen von 100, 10, 1 und 0,1 nM. HD22-r28alphaC zeigte weniger Bindung an Thrombin als Wildtyp-HD22 und die Modifikationen HD22-r3alphaT, HD22-r3IT und HD22-r28IC. Aus diesem Grund wurde HD22-r28alphaC in den weiteren Bindungsstudien nicht untersucht.

9.3. Struktur Azo-HD1

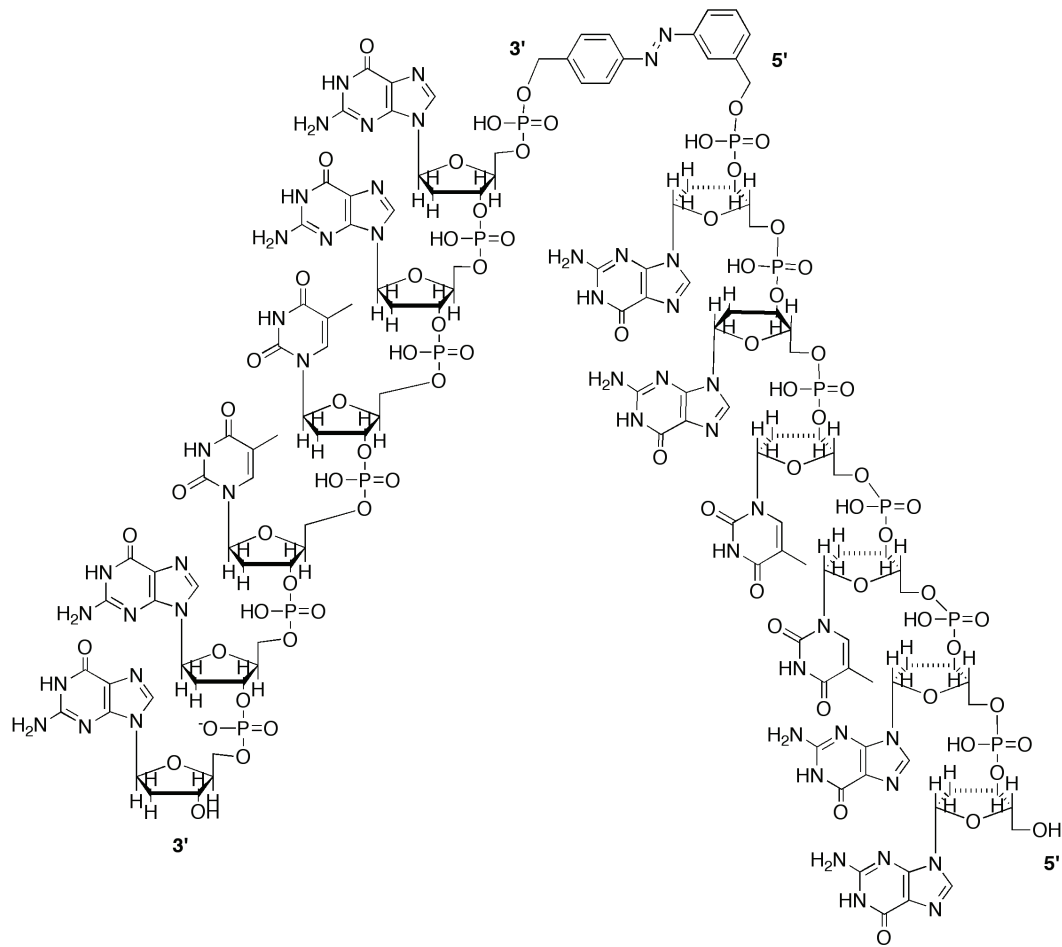


Abbildung 47. Die Azo-Gruppe in Azo-HD1 ersetzt die Basen der TGT-Schleife von Position 7 bis 9. Strukturformel des Aptamers Azo-HD1. Die Nucleobasen von Position 7 bis 9 wurden durch eine Azo-Benzolverbindung ersetzt, die die G-Quadruplex-Ausbildung lichtabhängig steuern sollte.

9.4. Aptamer basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES) zusätzliche Daten

9.4.1. Western Blot *cross-link* Quantifizierung

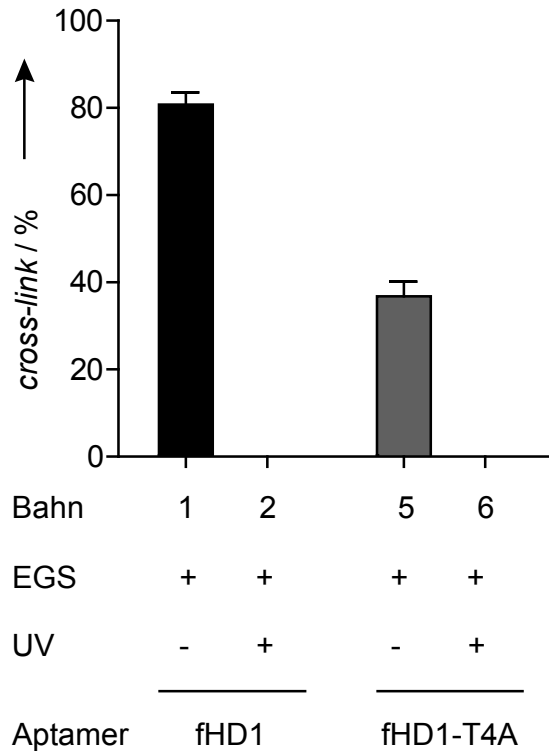


Abbildung 48. fHD1 bildete mit Thrombin im Western Blot eine intensivere *cross-link*-Bande als fHD1-T4A. Quantifizierung des Western Blots in Abbildung 34, ermittelt mit der Bio-Rad Quantity One Software, normiert auf das Gesamtsignal der einzelnen Bahn. Die obere Bande in Bahn 1 in Abbildung 34, gleichbedeutend mit dem Komplex von fHD1 und Thrombin, war wesentlich intensiver als die obere Bande in Bahn 5, welche den Komplex von fHD1-T4A und Thrombin repräsentiert. Nach Bestrahlung waren beide Banden und damit die Komplexe nicht mehr vorhanden (Bahn 2 und 6).

9.4.2. Hirudin-Test zusätzliche Daten

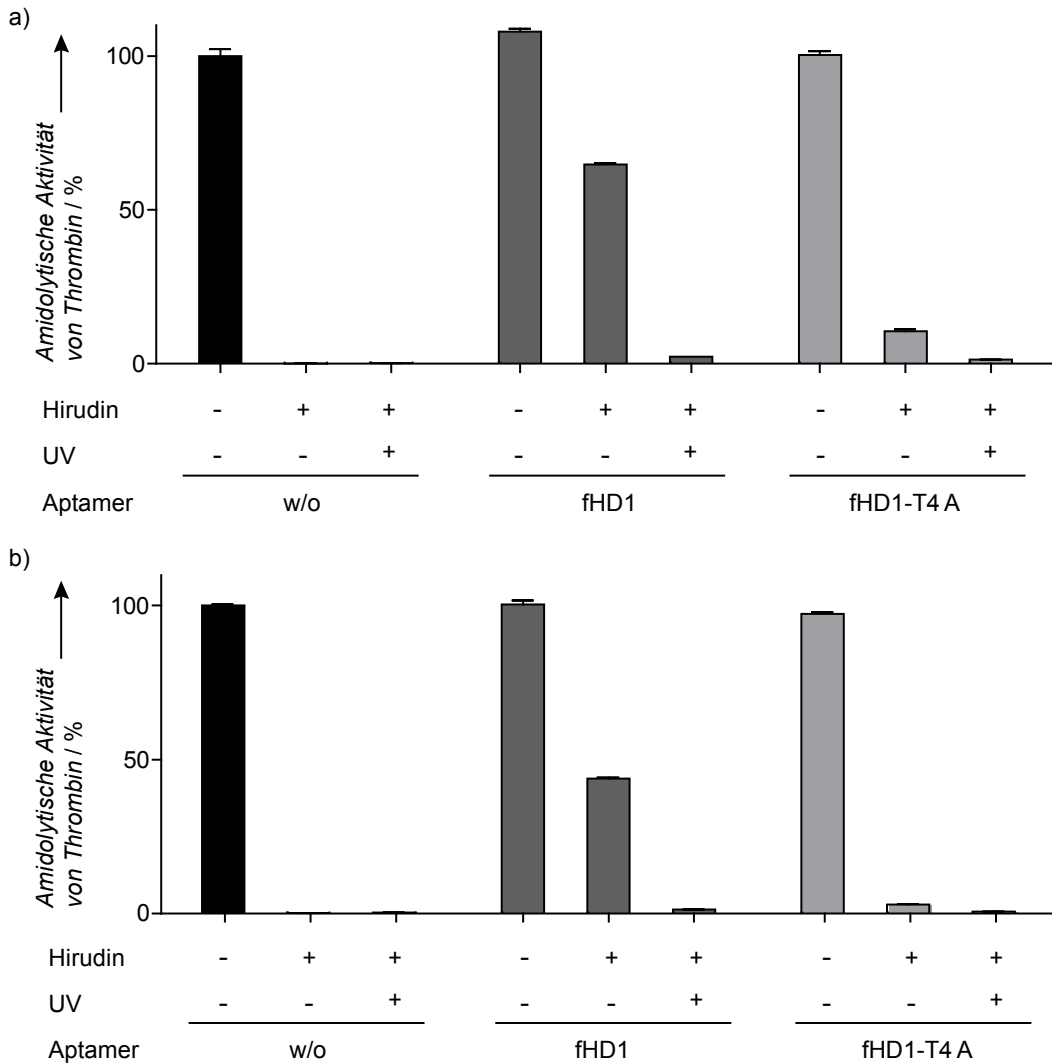


Abbildung 49. Der fHD1 *cross-link* verhinderte die Hirudin-abhängige Inhibition der amidolytischen Aktivität von Thrombin in Abhängigkeit der Hirudinkonzentration. Dargestellt ist die Änderung der amidolytischen Aktivität von 7 nM des Komplexes aus ABES und Thrombin, gemessen durch das Fluoreszenzsignal des fluorogenen Peptid-Substrats I-1140, in Relation zur Kinetik der amidolytischen Aktivität von 7 nM Thrombin ohne fHD1, Hirudin oder Bestrahlung (erster schwarzer Balken). Ohne Aptamer (schwarze Balken) wurde durch die Zugabe von a) 15 nM und b) 35 nM Hirudin die amidolytische Aktivität komplett inhibiert. Durch die ABES auf Basis von fHD1 blieb ein Teil der amidolytischen Aktivität trotz Hirudinzugabe erhalten, welche durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) inaktiviert wurde (dunkelgraue Balken). Die Menge an erhaltener amidolytischer Aktivität war abhängig von der Hirudinkonzentration, mehr Hirudin resultierte in weniger Protektion der amidolytischen Aktivität. Bei der ABES auf Basis von fHD1-T4A war der Anteil an erhaltener amidolytischer Aktivität deutlich geringer (hellgraue Balken).

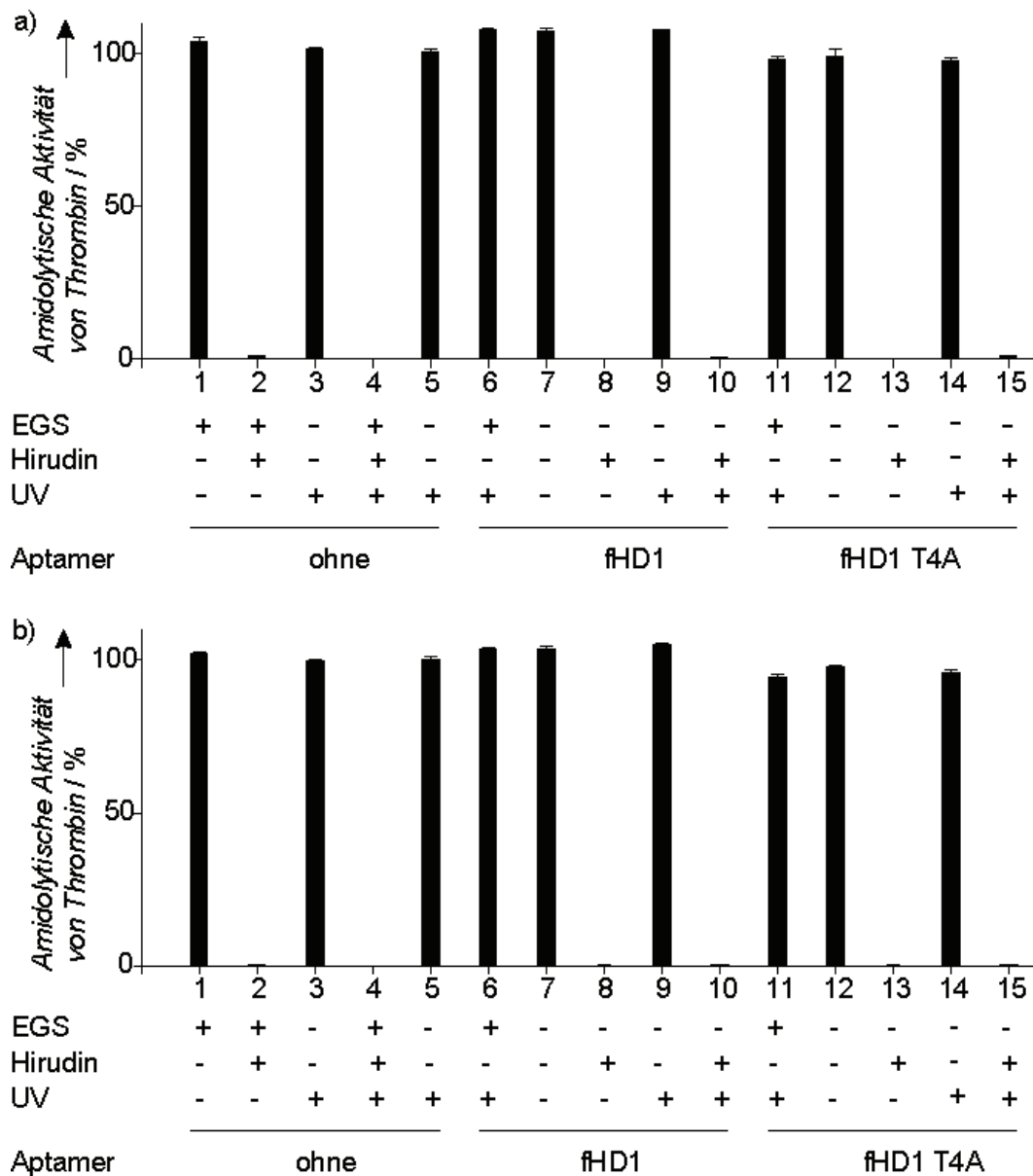


Abbildung 50. Weitere Datenpunkte des Hirudin-Tests. Dargestellt ist die Änderung der amidolytischen Aktivität des 7 nM fHD1-ABES von Thrombin in Gegenwart von a) 15 nM und b) 35 nM Hirudin. Gemessen wurde das Fluoreszenzsignal des fluorogenen Peptid-Substrats I-1140, in Relation zur Kinetik der amidolytischen Aktivität von Thrombin ohne Aptamer, Hirudin oder Bestrahlung. 1: Kein Aptamer + sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin – UV-Bestrahlung; 2: Kein Aptamer + sulfo-EGS-Verknüpfers + Hirudin – UV-Bestrahlung; 3: Kein Aptamer + sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin + UV-Bestrahlung; 4: Kein Aptamer + sulfo-EGS-Verknüpfers + Hirudin + UV-Bestrahlung; 5: Kein Aptamer - sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin + UV-Bestrahlung; 6: fHD1 + sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin + UV-Bestrahlung; 7: fHD1 - sulfo-EGS-Verknüpfers -Hirudin - UV-Bestrahlung; 8: fHD1 - sulfo-EGS-Verknüpfers + Hirudin - UV-Bestrahlung; 9: fHD1 - sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin + UV-Bestrahlung; 10: fHD1 - sulfo-EGS-Verknüpfers + Hirudin + UV-Bestrahlung; 11: fHD1-T4A + sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin + UV-Bestrahlung; 12: fHD1-T4A - sulfo-EGS-Verknüpfers – Hirudin - UV-Bestrahlung; 13: fHD1-T4A - sulfo-

EGS-Verknüpfers + Hirudin - UV-Bestrahlung; 14: fHD1-T4A - sulfo-EGS-Verknüpfers –Hirudin + UV-Bestrahlung; 15: fHD1-T4A - sulfo-EGS-Verknüpfers + Hirudin + UV-Bestrahlung. Eine Protektion der amidolytischen Aktivität trat nur bei einem cross-link mit fHD1 in Anwesenheit des sulfo-EGS-Verknüpfers auf (siehe Abbildung 49).

9.4.3. Gerinnungstest zusätzliche Daten

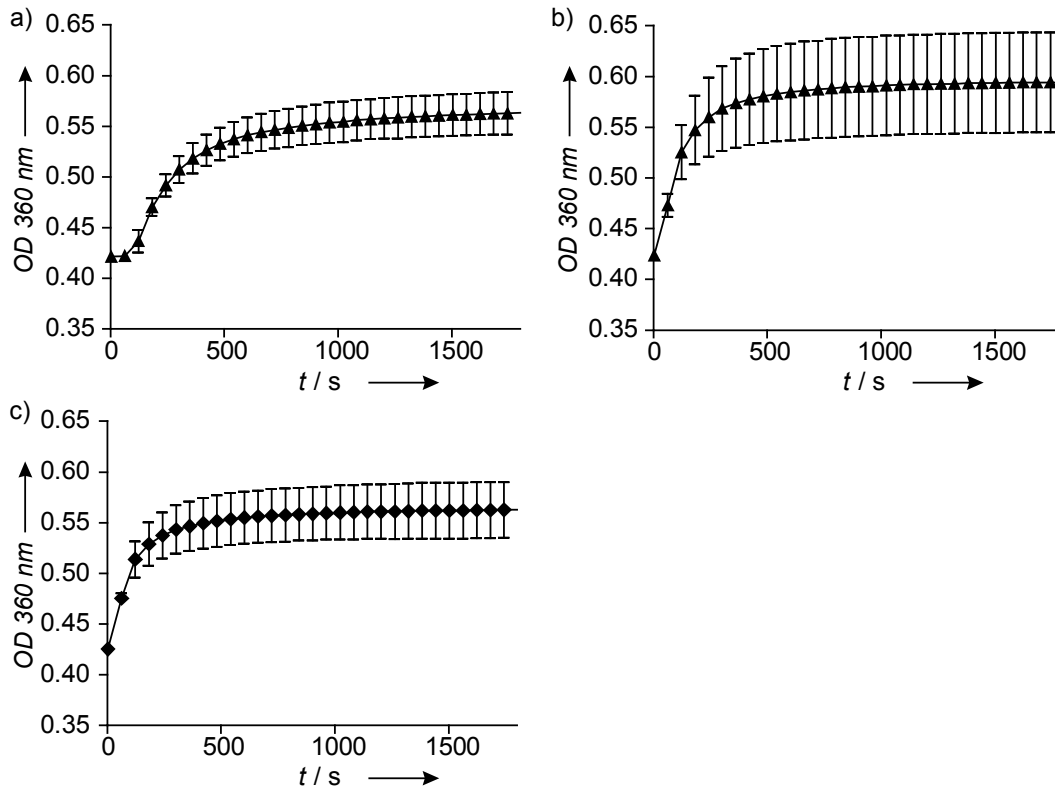


Abbildung 51. Weitere Datenpunkte des Plasma-Gerinnungstests. Plasma-Gerinnungstest mit fHD1-Thrombin Komplex vor und nach dreiminütiger UV-Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) mittels des UV-LED-Gerätes. Ein Fibrin-Gerinnsel führte zu einer erhöhten Absorption bei 360 nm. a) Thrombin mit fHD1 *cross-link* ohne sulfo-EGS-Verknüpfers vor UV-Bestrahlung b) Thrombin mit fHD1-T4A *cross-link* ohne sulfo-EGS-Verknüpfers vor UV-Bestrahlung c) Thrombin *cross-link* ohne Aptamer, mit sulfo-EGS-Verknüpfers vor UV-Bestrahlung. Eine Gerinnungsinhibition erfolgte nur bei dem cross-link mit fHD1 mit sulfo-EGS-Verknüpfers vor UV-Bestrahlung (siehe Abbildung 40) und nicht bei den hier dargestellten Kombinationen.

9.4.4. Zellviabilitätstest von C10.41

Durch die ABES-Technik konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie ein extrazelluläres Protein mithilfe von chemisch modifizierten Aptameren durch Licht gesteuert werden kann (siehe 4.5.2. Aptamer-basierte Epitop-Schutzgruppe (ABES)). Um zytosolische Proteine mittels Aptameren zu kontrollieren, sind Oligonukleotide nötig, die ihre Zielmoleküle innerhalb der Zelle binden und inhibieren. Das DNS-Aptamer C10.36 wurde gegen Vertreter der Cytohesin-Familie selektiert und mit einer photo-labilen Schutzgruppe versehen. Damit wurde die Inhibition von Cytohesinen in einem *in vitro* Testsystem ermöglicht.^[86] Für Cytohesine wurde gezeigt, dass diese die Signalweiterleitung des *Epidermal Growth* Faktor (EGF) Rezeptors und damit das Wachstum und die metabolische Aktivität von Krebszellen hemmt.^[54] Um festzustellen, ob C10.36 auch innerhalb der Zelle Cytohesine bindet und inhibiert, wurde das Aptamer in Rahmen dieser Arbeit auf Brustkrebszellen der Zelllinie MCF7 gegeben und die Zellviabilität mit dem MTT Testsystem gemessen. Weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.19. Zellviabilitätstest.

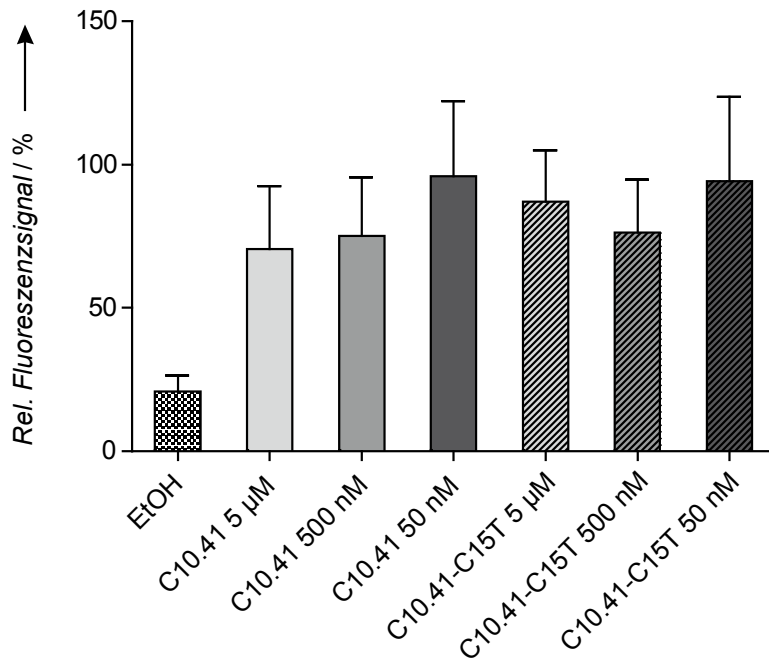


Abbildung 52. C10.41 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität verglichen mit der C10.41-C15T-Mutante. Zellviabilitätstest von Brustkrebszellen MCF7 der DNS-Aptamere C10.41, C10.41-C15T und einer 10%-Ethanol-Positivkontrolle. Relative Absorptionswerte normiert auf Zellen inkubiert mit Transfektionsreagenz ohne Aptamer. Das Aptamer C10.41 bindet *in vitro* an die Sec7 Domäne von Cytohesin-1, die Mutante C10.41-C15T zeigt keine Affinität an das Peptid.^[86] Da Cytohesine am Signalweg des *Epidermal Growth Factor* Rezeptors beteiligt sind und dessen Inhibition die Viabilität verschiedener Krebsarten reduziert,^[54] wurde hier untersucht, ob C10.41 in der Lage war, die Viabilität der Brustkrebszellen zu reduzieren. Wurde 10% Ethanol zu den Zellen gegeben, reduzierte sich Ihre Viabilität deutlich. Abhängig von der Aptamer-Konzentration nahm auch die Viabilität bei der Inkubation mit C10.41 ab, erreichte aber keine Signifikanz gegenüber den Werten für die nicht-bindende Mutante C10.41-C15T, es kann also nicht von einem C10.41-spezifischen Effekt gesprochen werden.

9.5. Eine photo-labile Schutzgruppe für M69

Für Gerinnungsproteine und *in vitro*-Anwendungen wurden viele lichtsichtbare Aptamere entwickelt. Für die Regulation von Prozessen innerhalb der Zelle konnten bisher allerdings nur lichtsichtbare small interfering RNS (siRNS), aber keine Intramere, hergestellt werden.^[6, 154] Da das DNS-Aptamer C10.41 mit der Zielproteinklasse Cytohesine die Viabilität von Brustkrebszellen in Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie EGF nicht beeinflusste (siehe Anhang 9.5. Zellviabilitätstest von C10.41, Abbildung 52), wurde davon ausgegangen, dass die *cage*-Varianten^[86] des Oligonukleotids in der Anwendung in Zellen nicht aktivierbar sind. Die Aktivität in Zytosol von unmodifiziertem M69, ein RNS-Aptamer spezifisch für Cytohesine, wurde, im Gegensatz zu C10.41, bereits in verschiedenen Studien gezeigt.^[52, 54, 155] Um ein funktionales System der Aptamer-medierten, lichtabhängigen Steuerung von Cytohesin-Aktivität zu realisieren, wurden in dieser Arbeit die Grundlagen zur Modifikation von M69 mit photo-labiler Schutzgruppe gelegt. Langfristiges Ziel der Studien war die Synthese eines M69-Aptamers, welches vor Bestrahlung nicht an sein Zielprotein, die Cytohesin1Sec7 Domäne^[52], bindet, und nach Bestrahlung die inhibitorische Aktivität wieder hergestellt wird. Dafür wurden in dieser Arbeit Punktmutanten identifiziert, die sich als Positionen für die photo-labilen Schutzgruppen eignen (Abbildungen 53 und 54) und Strategien zur Herstellung der RNS-Moleküle mittels Ligation entwickelt (Abbildungen 55 bis 57).

9.5.1. M69 Punktmutanten

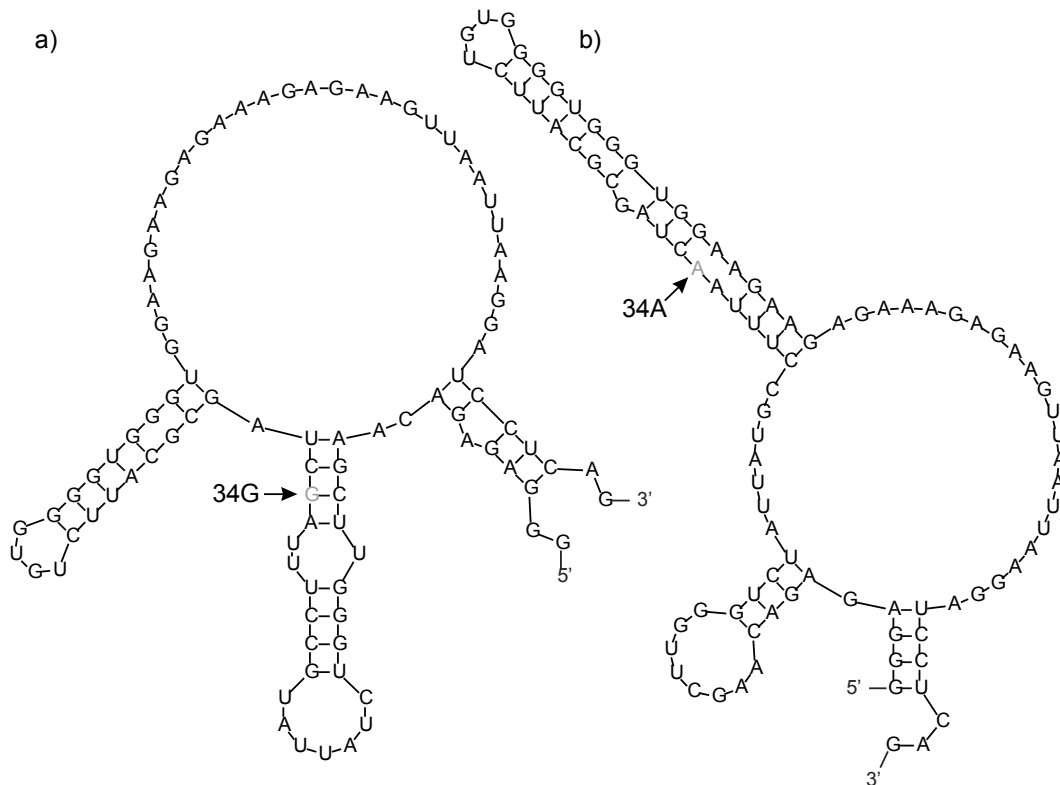


Abbildung 53. Die Struktur von M69 wird durch eine Mutation an Position 34 grundlegend verändert. Strukturvorhersage der RNS-Aptamere a) M69 und b) M69-G34A durch das Programm mfold von The RNA Institute at the College of Arts and Sciences of the University of Albany, New York.^[156] Für M69 wurde von mfold nur die hier gezeigte Struktur angegeben, für M69-G34A wurde für die Darstellung die Struktur mit der niedrigsten Gibbs-Energie gewählt. Die Mutation an Position 34 ergab eine komplett veränderte Strukturvorhersage und ließ damit erwarten, dass die Bindungseigenschaften dieser Mutante stark reduziert sein würden.

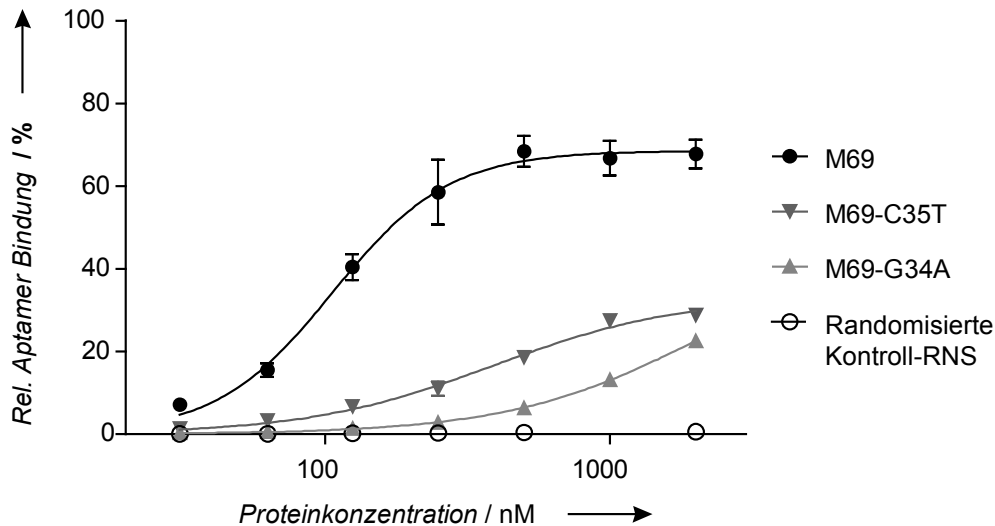


Abbildung 54. Die M69 Punktmutanten M69-G34A und M69-C35T haben im Vergleich zu Wildtyp-M69 eine niedrigere Affinität an die Cytohesin1Sec7 Domäne. Bindung von M69, M69-G34A, M69-C35T (einer Mutation in direkter Nachbarschaft zu der strukturändernden G35A-Mutation) und einer randomisierten Kontroll-RNS an die Cytohesin1Sec7 Domäne im Filterretentionstest (Proteinkonzentrationen von 31 bis 2000 nM, Details zur Durchführung siehe 7.4. Filterretention). Die Punktmutanten zeigten Affinität an das Zielprotein, aber im Vergleich zum Wildtyp-M69 war die Bindung stark reduziert. Die randomisierte Kontroll-RNS zeigte keine Affinität. Da bei M69-G34A die Bindungsreduktion zu der Cytohesin1Sec7 Domäne höher ausgeprägt war als bei M69-C35T, wurde die Position 34 in M69 als geeignete Stelle für die Einführung einer photo-labilen Schutzgruppe identifiziert und in den Konzepten für die RNS-Ligation (Siehe 9.6.2. RNS-Ligation) berücksichtigt.

Die DNS-Template der Punktmutanten von M69 wurden von Jennifer Wiecek mittels Mutagenese hergestellt.

9.5.2. RNS-Ligation

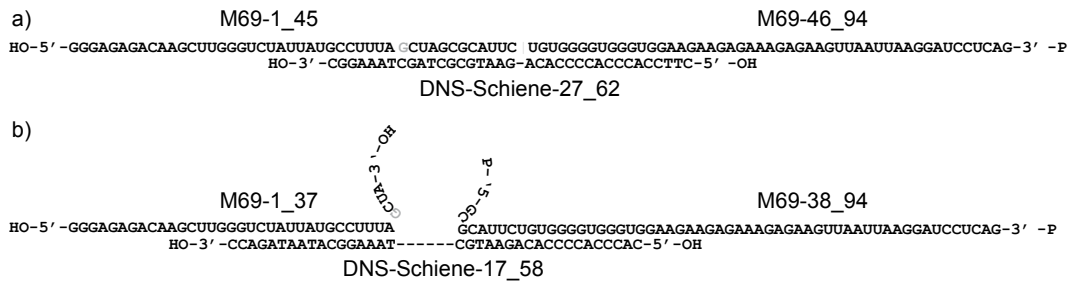


Abbildung 55. Die Ligation von M69 kann durch unterschiedliche Ligungsstrategien erfolgen. Ligungsstrategien von M69 Fragmenten mittels DNS-Schienen. Die Festphasensynthese von RNS mit mehr als 50 Basen ist zwar möglich, resultiert aber in starken Ausbeutenverlusten.^[157] Um eine photo-labile Schutzgruppe erfolgreich an Position 34 in das M69-Aptamer einzuführen, wurde daher eine Ligationmethode gewählt, in der das RNS-Molekül in zwei RNS-Fragmente, welche mittels Festphasensynthese hergestellt werden können, aufgeteilt wurde. Die RNS-Fragmente wurden durch eine DNS-Schiene in räumliche Nähe zueinander gebracht. Eine Ligase konnte daraufhin die beiden Enden miteinander verbinden.^[158] An der Ligationstelle trugen die RNS-Fragmente am 3'-Ende eine unmodifizierte Hydroxylgruppe und am 5'-Ende eine Monophosphatgruppe. Um inkorrekte Ligationen zu vermeiden, führte das nicht an der Ligation beteiligte 3'-Ende ebenfalls eine Monophosphatgruppe. Die zwei unterschiedlichen Ligungsstrategien wurden einerseits mit komplett an der DNS-Schiene gepaarten, stumpfen Enden (a), 45_46 Ligation), andererseits mit ungepaarten Donor- und Akzeptorenden (b), 37_38 Ligation) durchgeführt. Es konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die Effektivität der Ligation von den Nukleobasen an der Schnittstelle abhängt, und zwar für das 3'-OH-Ende $A > C \geq G > U$ und für das 5'-Monophosphat $pC > pU \approx pA > pG$.^[159] Daher wurden die Schnittstellen entsprechend gewählt. Die 45_46 Ligation sorgt für eine größere räumliche Nähe der Enden der RNS-Fragmente und daher die Aussicht auf höhere Ausbeuten, allerdings soll die photo-labile Schutzgruppe die Basen-Paarung innerhalb des Aptamers verhindern und stört daher unter Umständen die Duplexbildung von DNS-Schiene-27_62 und RNS-Fragment M69-1_45. Dies ist durch die ungepaarten Enden bei der 37_38 Ligation nicht der Fall. Im Folgenden wurde getestet, ob die Ligation prinzipiell, das heißt zunächst ohne photo-labile Schutzgruppe, funktioniert. Die Ligungspositionen und Längen der DNS-Schienen wurden durch Claudia Höbartner entwickelt.

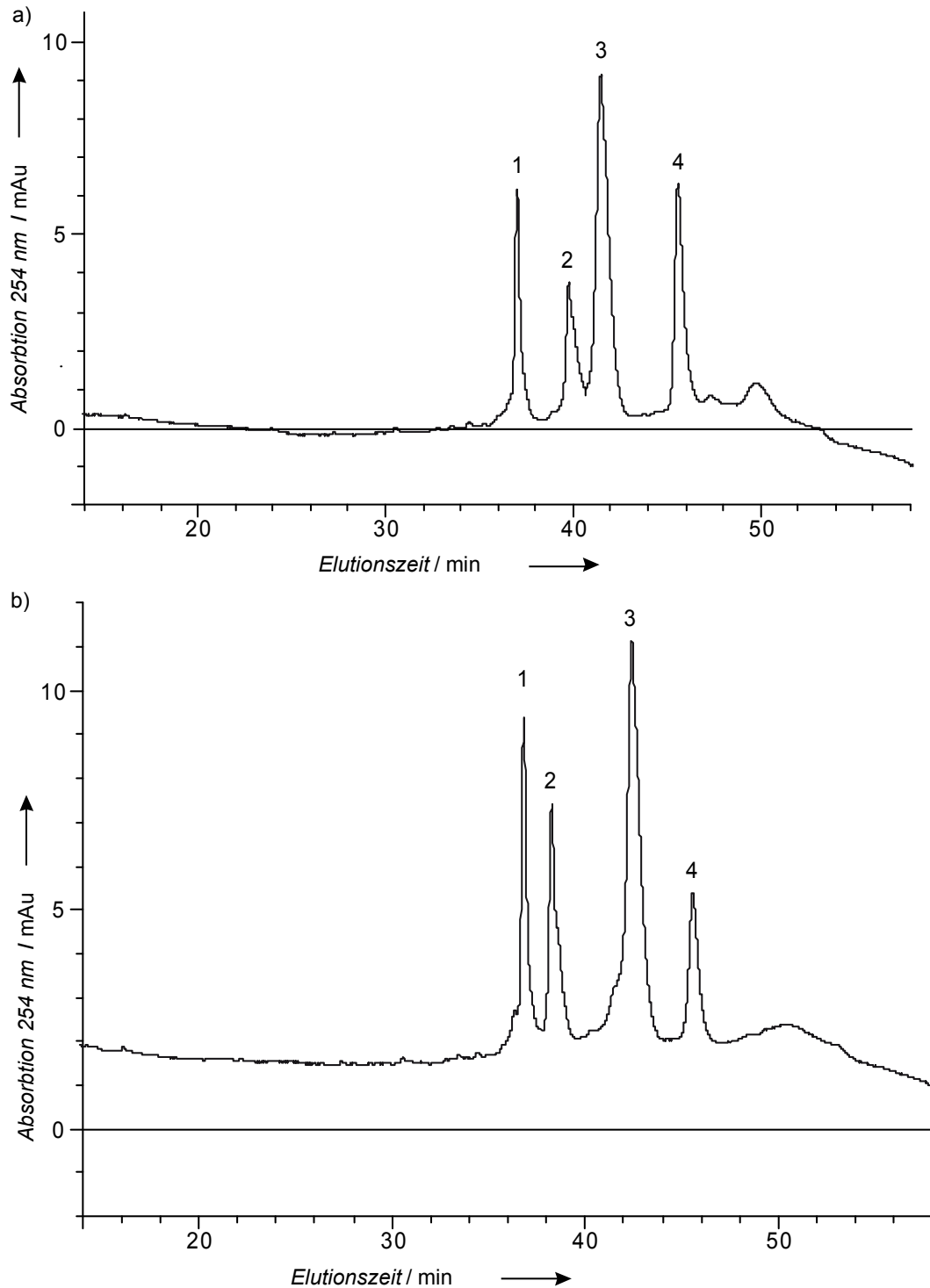


Abbildung 56. Bei beiden Ligationen (45_46 und 37_38) entstand ein Ligationsprodukt, welches sich mittels Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (IE-HPLC) von den Ausgangsprodukten abtrennen ließ. Absorbtionschromatogramme ($\lambda = 254 \text{ nm}$) von IE-HPLC-Trennungen der Ligationen nach Phenol-Chloroform Extraktion. a) 45_46 Ligation ohne photo-labile Schutzgruppe Peak 1: DNS-Schiene 27_62 Peak 2: M69-1_45 Peak 3: M69-45_46 Peak 4: M69 Ligationsprodukt b) 37_38 Ligation

ohne photo-labile Schutzgruppe Peak 1: M69-1_37 Peak 2: DNS-Schiene 27_62 Peak 3: M69-37_38 Peak 4: M69 Ligationsprodukt.

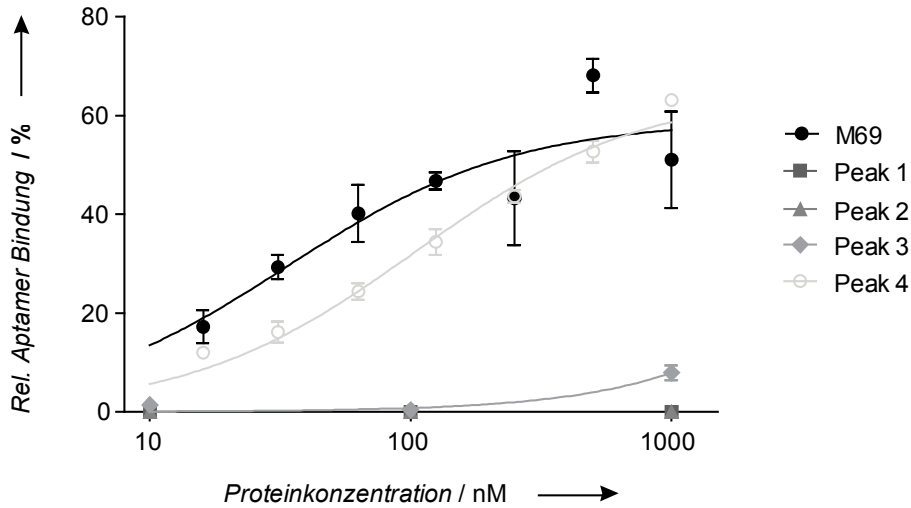


Abbildung 57. M69 war nach der Ligation und der HPLC-Aufreinigung funktional.

Bindung der Peaks aus der 45_46 Ligation (Abbildung 56 a) 45_46 Ligation ohne photo-labile Schutzgruppe) und eine M69-Positivkontrolle an die Cytohesin1Sec7 Domäne im Filterretentionstest (Proteinkonzentrationen 10 von bis 1000 nM). Die HPLC-Peaks wurden am 5'-Ende ³²P-phosphoryliert, die M69-Positivkontrolle wurde in einer radioaktiven Transkription hergestellt.

9.6. Glukosamin-6-Phosphat mit photo-labilen und Acetopropyl-Schutzgruppen

Bestrahlungsabhängige molekularbiologische Vorgänge wurden nicht nur durch Oligonukleotide mit photo-sensiblen Schutzgruppen erreicht. Lichtinduzierte Transkriptionskontrolle wurde mittels sich selbst schneidender RNS-Sequenzen durch *caging* von Toyocamycin, einem Inhibitor des *Hammerhead*-Ribozyms, in einem Modellsystem realisiert.^[160] In diesem Ansatz wurde das Ribozym inaktiviert, was die Runterregulation der Genexpression durch das Schneiden der mRNA verhinderte. Damit wurde ein System zur lichtabhängigen Aktivierung der Transkription geschaffen. Zur lichtabhängigen Inaktivierung der Genexpression wurde in einer anderen Studie das glmS-Ribozym verwendet. Diese Sequenz schneidet sich nach Bindung des Cofaktors Glukosamin-6-Phosphat (GluN6P) selbst und verhindert damit die Transkription der mRNA.^[161] Wurde nun eine mit einer photo-labilen Schutzgruppe inaktivierte Version des GluN6P, GluN6P-*caged*, in Retikulozyten-Lysat eingebracht und bestrahlt, konnte die Translation eines Konstruktes aus glmS-Ribozym und grün fluoreszierendem Protein lichtabhängig gesteuert werden.



Abbildung 58. Die mRNA wurde durch das glmS-Ribozym (*glmS-riboswitch*, rot) nach Entschützung von GluN6P-*caged* (cGlcN6P) gespalten. mRNA-Konstrukt mit *enhanced* grün fluoreszierendem Protein (EGFP, grün) und dem glmS-Ribozym (rot). Wurde dieses Konstrukt und GluN6P-*caged* in Retikulozyten-Lysat eingebracht und bestrahlt, band entschütztes GluN6P an das glmS-Ribozym. Dieses katalysierte seine eigene Spaltung. Dadurch wurde das Ablesen der mRNA unterbunden, die Translation von EGFP wurde erniedrigt und ergab damit ein erniedrigtes Fluoreszenzsignal. Abbildung aus ^[149].

Dieses Konstrukt wurde in humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms kloniert.^[149] Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Translation in diesen Zellen durch Bestrahlung kontrolliert werden kann. Es wurde das Fluoreszenzsignal von *enhanced* grün fluoreszierendem Protein in den Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Weitere Angaben zur Durchführung siehe 7.21. Durchflusszytometrie von glmS-eGFP HeLa-Zellen.

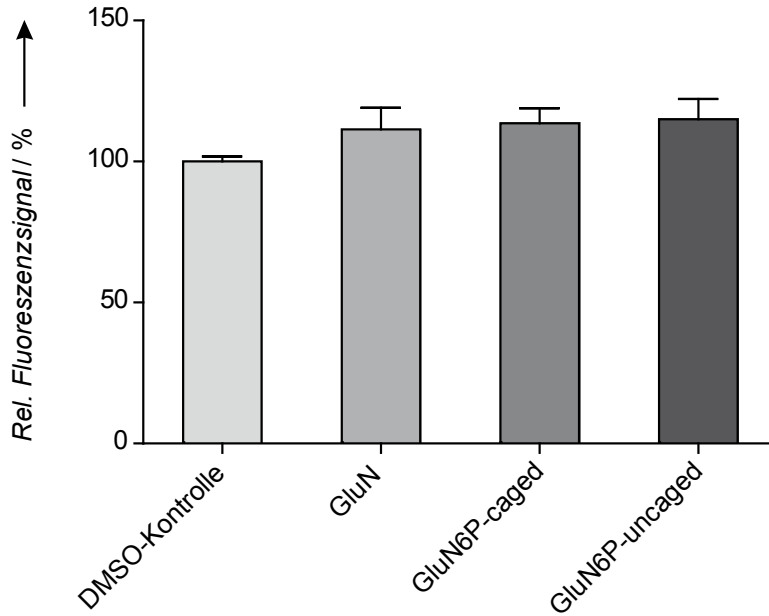


Abbildung 59. Lichtaktiviertes Glukosamin-6-Phosphat-caged hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von glmS-eGFP-HeLa-Zellen in der Durchflusszytometrie. Fluoreszenzsignal von durchflusszytometrischen Messungen von HeLa Zellen, die mit dem Glukosamin-6-Phosphat-Synthetase(glmS)-Ribozym aus *Bacillus subtilis* in der 3'-UTR der mRNA des *enhanced* grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) stabil transfiziert waren (Abbildung 58),^[149] nach Inkubation mit unterschiedlichen Hexosen, normiert auf die DMSO-Negativkontrolle. Sollte eine der Hexosen auf das glmS-Ribozym Einfluss nehmen, würde es den Poly(A)-Schwanz der m-RNS abschneiden, damit die Translation und folglich auch das Fluoreszenzsignal von eGFP reduzieren. Dies war weder für unmodifiziertes Glukosamin (GluN), noch für die unbestrahlte (GluN6P-caged) und UV-bestrahlte Version von Glukosamin-6-Phosphat mit photo-labiler und Acetopropyl-Schutzgruppe(n) (GluN6P-uncaged) der Fall.

9.7. Sequenzen

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
APT	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -ATCTACGAATTCATCAGGGCTAAAGAGTGCAG AGTTACTTAG
Randomisierte Kontroll-DNS	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TTTTTTTTTCGATCGAG
C10.36	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGCAGGGGGGTTAG
C10.36-G24A	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGACAGGGGGGTTAG
C10.36-r13P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTPTGGTGGGTGGGCAGGGGGGTTA G
C10.36-FAM	FAM- CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGCAGGGGGGTTAG
C10.36-G24A-FAM	FAM- CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGACAGGGGGGTTAG
C10.36-Atto-647	Atto-647-CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGCAGGGGGG TTAG
C10.36-r17P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTGTGGPGGGTGGGCAGGGGGGTTA G
C10.36-r18P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTGTGGTPGGTGGGCAGGGGGGTTA G
C10.36-r21P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTGTGGTGGGPGGGCAGGGGGGTTA G
C10.36-r25P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGPAGGGGGGTTA G
C10.36-r26P-FAM	FAM-CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGCPGGGGGGTTA G
C10.36-r25O	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGOAGGGGGGTTAG
C10.36-r25Y	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGYAGGGGGGTTAG
C10.36-i25P	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGPCAGGGGGGTTAG
C10.36 i26P	CTAACCCCGGGTGTGGTGGGTGGGCPAGGGGGGTTAG
HD1	GGTTGGTGTGGTTGG
Azo-HD1	GGTTGG-Azo-GGTTGG
HD1-T4A	GGTAGGTGTGGTTGG
HD1-r7P	GGTTGGPGTGGTTGG
HD1-r8P	GGTTGGTPTGGTTGG
HD1-r9P	GGTTGGTGPGGTTGG
HD1-r7O	GGTTGGOGTGGTTGG
HD1-r8O	GGTTGGTOTGGTTGG
HD1-r9O	GGTTGGTGOGGTTGG
HD1-r7Y	GGTTGGYGTGGTTGG
HD1-r8Y	GGTTGGTYTGGTTGG
HD1-r9Y	GGTTGGTGYGGTTGG
HD1-i1P	PGGTTGGTGTGGTTGG

HD1-i3P	GGPTTGGTGTGGTTGG
HD1-i6P	GGTTGPGTGTGGTTGG
HD1-i8P	GGTTGGPTGTGGTTGG
HD1-i9P	GGTTGGTPGTGGTTGG
HD1-i12P	GGTTGGTGTGGPTTGG
HD1-i8O	GGTTGGTOGTGGTTGG
HD1-i9O	GGTTGGTGOTGGTTGG
HD1-22	GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGT AGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD1-22-bio	GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGT AGGGCAGGTTGGGGTGACT-Biotin
HD1-22-r8P	GGTTGGTPTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGT AGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD1-22-r7O	GGTTGGOGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGT AGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD1-22-r8Y	GGTTGGTYTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGT AGGGCAGGTTGGGGTGACT
HS02-52G	GCCTCCTAACTGAGCTGTACTCGACTTATCCCGGATGGGG CTCTTAGGAGGC
HS02-52G-bio	GCCTCCTAACTGAGCTGTACTCGACTTATCCCGGATGGGG CTCTTAGGAGGC-Biotin
HD22	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-G6A	AGTCCATGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-T10A	AGTCCGTGGAAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-A11T	AGTCCGTGGTTGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-G12A	AGTCCGTGGTAAGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-G13A	AGTCCGTGGTAGAGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-G14A	AGTCCGTGGTAGGACAGGTTGGGGTGACT
HD22-C15T	AGTCCGTGGTAGGGTAGGTTGGGGTGACT
HD22-A16T	AGTCCGTGGTAGGGCTGGTTGGGGTGACT
HD22-T19A	AGTCCGTGGTAGGGCAGGATGGGGTGACT
HD22-T20A	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTAGGGTGACT
HD22-r6P	AGTCCPTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-r7P	AGTCCGPGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-r14P	AGTCCGTGGTAGGPPCAGGTTGGGGTGACT
HD22-r15P	AGTCCGTGGTAGGGPAGGTTGGGGTGACT
HD22-r16P	AGTCCGTGGTAGGGCPGGTTGGGGTGACT
HD22-r23P	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGPGTGACT
HD22-r23K	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGKGTGACT

HD22-r23M	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGMGTGACT
HD22-r15O	AGTCCGTGGTAGGGOAGGTTGGGGTGACT
HD22-r16O	AGTCCGTGGTAGGGCOGGTTGGGGTGACT
HD22-i16O	AGTCCGTGGTAGGGCOAGGTTGGGGTGACT
HD22-r23O	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGOGTGACT
HD22-r3IT	AGITCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-r28IC	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGAICT
HD22-r3alphaT	AGaTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
HD22-r28alphaC	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGAaCT
M69	GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUAG CGCAUUCUGUGGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAG UAAUUAAGGAUCCUCAG
M69-G34A	GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAACUAG CGCAUUCUGUGGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAG UAAUUAAGGAUCCUCAG
M69-C35T	GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGTUAG CGCAUUCUGUGGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAG UAAUUAAGGAUCCUCAG
Randomisierte Kontroll-RNS	GGGAGAGGAGGGAAGTCTACATCTTTGGGAAGGAGTTAG GGCGGAGGGAATGAAGATGGAGTATAACCCAATAGAAGA AGATTTCTGGAGTTGACGAAGCTT
M69 DNS Templat	TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTCT ATTATGCCTTTAGCTAGCGCATTCTGTGGGGTGGGTGGAG GAGAAAGAGAAGTTAATTAAGGATCCTCAG
M69 PR1 39 Primer	TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACAAGCTTGGGTC
M69 PR1 30 Primer	CTGAGGATCCTTAATTAAGTTCTCTTTCTC
M69-1_37	GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUA
M69-38_94	Phosphat-GCGCAUUCUGUGGGGUGGGUGGAAGAAGAGA AAGAGAAGUAAUUAAGGAUCCUCAG-Phosphat
M69-1_45	GGGAGAGACAAGCUUGGGUCUAUUAUGCCUUUAGCUAG CGCAUUC
M69-46_94	Phosphat-UGUGGGGUGGGUGGAAGAAGAGAAAGAGAAGU UAAUUAAGGAUCCUCAG-Phosphat
DNS-Schiene 17_58	CCAGATAATACGGAAATCGTAAGACACCCACCCAC
DNS-Schiene 27_62	CGGAAATCGATCGCGTAAGACACCCACCCACCTTC

9.8. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
%Vol.	Volumenprozent
ABES	Aptamer-basierte Epitop-Schutzgruppe
APC	Aktiviertes Protein C
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumine</i>)
Ca	Kalzium (<i>Calcium</i>)
Cl	Chlorid
CTP	Cytidintriphosphat
Cyt1Sec7	Cytohesin1Sec7 Domäne
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK2	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase 2
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GPIb	Glykoprotein Ib
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
IE-HPLC	Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Anhang

HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
K_d	Dissoziationskonstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LNS	Locked-Nukleinsäure
M	molar
Mg	Magnesium
min	Minute(n)
m	Meter
mol	Mol
Na	Natrium
NTP	Nukleosidtriphosphat
OECA	Oligonukleotid-basiertes Ergreifen von Enzymen (<i>oligonucleotide-based enzyme capture assay</i>)
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffer saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PSL	Photo-stimulierte Lumineszenz
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sulfo-EGS	Sulfo-[Ethylen Glycolbis(Succinimidylsuccinat)]
Sulfo-NHS	Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimid
T_m	Schmelztemperatur (<i>Melting temperature</i>)
TINA	Verdrehte interkalierende Nukleinsäure (<i>Twisted intercalating nucleic acid</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt

9.9. Literaturverzeichnis

- [1] D. A. Wheeler, M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, W. He, Y. J. Chen, V. Makhijani, G. T. Roth, X. Gomes, K. Tartaro, F. Niazi, C. L. Turcotte, G. P. Irzyk, J. R. Lupski, C. Chinault, X. Z. Song, Y. Liu, Y. Yuan, L. Nazareth, X. Qin, D. M. Muzny, M. Margulies, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, J. M. Rothberg, *Nature* **2008**, *452*, 872-876.
- [2] S. V. Hodgson, P. J. Morrison, M. Irving, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **2004**, *129C*, 56-64.
- [3] J. Casado-Vela, A. Cebrian, M. T. Gomez del Pulgar, E. Sanchez-Lopez, M. Vilaseca, L. Menchen, C. Diema, S. Selles-Marchart, M. J. Martinez-Esteso, N. Yubero, R. Bru-Martinez, J. C. Lacal, *Proteomics* **2011**, *11*, 590-603.
- [4] E. N. Brody, L. Gold, R. M. Lawn, J. J. Walker, D. Zichi, *Expert Rev Mol Diagn* **2010**, *10*, 1013-1022.
- [5] E. Brody, L. Gold, M. Mehan, R. Ostroff, J. Rohloff, J. Walker, D. Zichi, *J Mol Biol* **2012**, *422*, 595-606.
- [6] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 8446-8476.
- [7] V. Thiviyanathan, D. G. Gorenstein, *Proteomics Clin Appl* **2012**, *6*, 563-573.
- [8] G. Kohler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- [9] G. Mayer, *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 2672-2689.
- [10] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [11] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- [12] C. K. O'Sullivan, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2002**, *372*, 44-48.
- [13] a) T. S. Romig, C. Bell, D. W. Drolet, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1999**, *731*, 275-284; b) M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle, *Nucleic acids research* **2003**, *31*, e110.
- [14] D. W. Drolet, L. Moon-McDermott, T. S. Romig, *Nat Biotechnol* **1996**, *14*, 1021-1025.
- [15] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 11768-11769.
- [16] Z. Zhang, W. Yang, J. Wang, C. Yang, F. Yang, X. Yang, *Talanta* **2009**, *78*, 1240-1245.
- [17] a) E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner, *Anal Chem* **2009**, *81*, 9291-9298; b) A. J. Bonham, K. Hsieh, B. S. Ferguson, A. Vallee-Belisle, F. Ricci, H. T. Soh, K. W. Plaxco, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 3346-3348.
- [18] A. Erdem, G. Congur, H. Karadeniz, P. E. Canavar, *Chemical Sensors* **2011**, *1*, 1-8.
- [19] a) T. Hianik, V. Ostatna, M. Sonlajtnerova, I. Grman, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 127-133; b) G. S. Bang, S. Cho, B. G. Kim, *Biosens Bioelectron* **2005**, *21*, 863-870; c) D. A. Di Giusto, W. A. Wlassoff, J. J. Gooding, B. A. Messerle, G. C. King, *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, e64.
- [20] J. Muller, T. Becher, J. Braunstein, P. Berdel, S. Gravius, F. Rohrbach, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 6075-6078.
- [21] J. Muller, M. Friedrich, T. Becher, J. Braunstein, T. Kupper, P. Berdel, S. Gravius, F. Rohrbach, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, *J Thromb Haemost* **2012**, *10*, 390-398.
- [22] T. Wang, J. Ray, *Protein Cell* **2012**, *3*, 739-754.

- [23] N. Feucht, H. Matthias, C. P. Lohmann, M. Maier, *Clin Ophthalmol* **2008**, *2*, 253-259.
- [24] M. Famulok, M. Blind, G. Mayer, *Chem Biol* **2001**, *8*, 931-939.
- [25] G. S. Baird, *Am J Clin Pathol* **2010**, *134*, 529-531.
- [26] W. O. Ho, S. Krause, C. J. McNeil, J. A. Pritchard, R. D. Armstrong, D. Athey, K. Rawson, *Anal Chem* **1999**, *71*, 1940-1946.
- [27] B. Li, S. Dong, E. Wang, *Chem Asian J* **2010**, *5*, 1262-1272.
- [28] A. Erdem, H. Karadeniz, G. Mayer, M. Famulok, A. Caliskana, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1278 – 1284.
- [29] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E. N. Brody, J. Carter, A. B. Dalby, B. E. Eaton, T. Fitzwater, D. Flather, A. Forbes, T. Foreman, C. Fowler, B. Gawande, M. Goss, M. Gunn, S. Gupta, D. Halladay, J. Heil, J. Heilig, B. Hicke, G. Husar, N. Janjic, T. Jarvis, S. Jennings, E. Katilius, T. R. Keeney, N. Kim, T. H. Koch, S. Kraemer, L. Kroiss, N. Le, D. Levine, W. Lindsey, B. Lollo, W. Mayfield, M. Mehan, R. Mehler, S. K. Nelson, M. Nelson, D. Nieuwlandt, M. Nikrad, U. Ochsner, R. M. Ostroff, M. Otis, T. Parker, S. Pietrasiewicz, D. I. Resnicow, J. Rohloff, G. Sanders, S. Sattin, D. Schneider, B. Singer, M. Stanton, A. Sterkel, A. Stewart, S. Stratford, J. D. Vaught, M. Vrkljan, J. J. Walker, M. Watrobka, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, A. Wolfson, S. K. Wolk, C. Zhang, D. Zichi, *PLoS One* **2010**, *5*, e15004.
- [30] R. M. Ostroff, W. L. Bigbee, W. Franklin, L. Gold, M. Mehan, Y. E. Miller, H. I. Pass, W. N. Rom, J. M. Siegfried, A. Stewart, J. J. Walker, J. L. Weissfeld, S. Williams, D. Zichi, E. N. Brody, *PLoS One* **2010**, *5*, e15003.
- [31] J. C. Waters, *J Cell Biol* **2009**, *185*, 1135-1148.
- [32] Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li, W. Tan, *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 4900-4907.
- [33] H. Shi, Z. Tang, Y. Kim, H. Nie, Y. F. Huang, X. He, K. Deng, K. Wang, W. Tan, *Chem Asian J* **2010**, *5*, 2209-2213.
- [34] Y. Wu, K. Sefah, H. Liu, R. Wang, W. Tan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 5-10.
- [35] E. M. Reyes-Reyes, Y. Teng, P. J. Bates, *Cancer Res* **2010**, *70*, 8617-8629.
- [36] J. E. Rosenberg, R. M. Bambury, E. M. Van Allen, H. A. Drabkin, P. N. Lara, Jr., A. L. Harzstark, N. Wagle, R. A. Figlin, G. W. Smith, L. A. Garraway, T. Choueiri, F. Erlandsson, D. A. Laber, *Invest New Drugs* **2014**, *32*, 178-187.
- [37] a) J. Ai, W. Guo, B. Li, T. Li, D. Li, E. Wang, *Talanta* **2012**, *88*, 450-455;
b) H. Li, Y. Mu, J. Lu, W. Wei, Y. Wan, S. Liu, *Analytical chemistry* **2014**;
c) W. Hwang do, H. Y. Ko, J. H. Lee, H. Kang, S. H. Ryu, I. C. Song, D. S. Lee, S. Kim, *J Nucl Med* **2010**, *51*, 98-105.
- [38] M. S. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 5190-5193.
- [39] K. M. U. Schöler, Universität Bonn (Bonn), **2011**.
- [40] E. S. Gragoudas, A. P. Adamis, E. T. Cunningham, Jr., M. Feinsod, D. R. Guyer, *N Engl J Med* **2004**, *351*, 2805-2816.
- [41] C. Tuerk, S. MacDougal, L. Gold, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 6988-6992.
- [42] Z. Klase, R. Winograd, J. Davis, L. Carpio, R. Hildreth, M. Heydarian, S. Fu, T. McCaffrey, E. Meiri, M. Ayash-Rashkovsky, S. Gilad, Z. Bentwich, F. Kashanchi, *Retrovirology* **2009**, *6*, 18.
- [43] R. Yamamoto, K. Murakami, K. Taira, P. K. R. Kumar, *Gene Therapy and Molecular Biology* **1998**, *1*, 451-466.

- [44] A. Mazumder, N. Neamati, J. O. Ojwang, S. Sunder, R. F. Rando, Y. Pommier, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13762-13771.
- [45] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic acids research* **2006**, *34*, e73.
- [46] T. C. Chu, J. W. Marks, 3rd, L. A. Lavery, S. Faulkner, M. G. Rosenblum, A. D. Ellington, M. Levy, *Cancer Res* **2006**, *66*, 5989-5992.
- [47] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 6315-6320.
- [48] M. Pofahl, J. Wengel, G. Mayer, *Nucleic Acid Ther* **2014**.
- [49] Y. A. Shieh, S. J. Yang, M. F. Wei, M. J. Shieh, *ACS Nano* **2010**, *4*, 1433-1442.
- [50] K. Wang, M. You, Y. Chen, D. Han, Z. Zhu, J. Huang, K. Williams, C. J. Yang, W. Tan, *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 6098-6101.
- [51] M. Famulok, G. Mayer, *ChemBiochem* **2005**, *6*, 19-26.
- [52] G. Mayer, M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 4961-4965.
- [53] A. Schurmann, M. Schmidt, M. Asmus, S. Bayer, F. Fliegert, S. Kolling, S. Massmann, C. Schilf, M. C. Subauste, M. Voss, K. H. Jakobs, H. G. Joost, *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 9744-9751.
- [54] A. Bill, A. Schmitz, B. Albertoni, J. N. Song, L. C. Heukamp, D. Walrafen, F. Thorwirth, P. J. Verveer, S. Zimmer, L. Meffert, A. Schreiber, S. Chatterjee, R. K. Thomas, R. T. Ullrich, T. Lang, M. Famulok, *Cell* **2010**, *143*, 201-211.
- [55] a) J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chemistry & biology* **1996**, *3*, 611-617; b) M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 1316-1332.
- [56] I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella, F. Sica, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 8119-8128.
- [57] R. Giraldo, M. Suzuki, L. Chapman, D. Rhodes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 7658-7662.
- [58] T. Chang, C. Qi, J. Meng, N. Zhang, T. Bing, X. Yang, Z. Cao, D. Shangguan, *PLoS One* **2013**, *8*, e62348.
- [59] N. Jing, M. E. Hogan, *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 34992-34999.
- [60] K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, A. Tulinsky, *J Biol Chem* **1993**, *268*, 17651-17654.
- [61] D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J Mol Biol* **1997**, *272*, 688-698.
- [62] I. Russo Krauss, A. Pica, A. Merlino, L. Mazzarella, F. Sica, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2013**, *69*, 2403-2411.
- [63] J. Muller, B. Wulffen, B. Potzsch, G. Mayer, *ChemBiochem* **2007**, *8*, 2223-2226.
- [64] C. R. Ireson, L. R. Kelland, *Mol Cancer Ther* **2006**, *5*, 2957-2962.
- [65] J. Muller, B. Isermann, C. Ducker, M. Salehi, M. Meyer, M. Friedrich, T. Madhusudhan, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, *Chem Biol* **2009**, *16*, 442-451.
- [66] H. Ulrich, *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 305-326.
- [67] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L. Beaucage ... [et al.]* **2001**, Chapter 3, Unit 3.3.
- [68] F. Tolle, G. Mayer, *Chemical Science* **2013**, *4*, 60-67.
- [69] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, D. A. Spivak, *Anal Bioanal Chem* **2008**, *390*, 1009-1021.

- [70] J. B. Millar, E. Rozengurt, *The Journal of biological chemistry* **1990**, *265*, 12052-12058.
- [71] D. L. Costantini, K. Bateman, K. McLarty, K. A. Vallis, R. M. Reilly, *J Nucl Med* **2008**, *49*, 1498-1505.
- [72] R. E. Wang, Y. Zhang, J. Cai, W. Cai, T. Gao, *Curr Med Chem* **2011**, *18*, 4175-4184.
- [73] R. T. Raines, *Chem Rev* **1998**, *98*, 1045-1066.
- [74] a) E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, Jr., D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 123-132; b) J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 20556-20567.
- [75] F. Darfeuille, J. B. Hansen, H. Orum, C. Di Primo, J. J. Toulme, *Nucleic acids research* **2004**, *32*, 3101-3107.
- [76] F. J. Hernandez, N. Kalra, J. Wengel, B. Vester, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 6585-6587.
- [77] P. R. Mallikaratchy, A. Ruggiero, J. R. Gardner, V. Kuryavyi, W. F. Maguire, M. L. Heaney, M. R. McDevitt, D. J. Patel, D. A. Scheinberg, *Nucleic acids research* **2011**, *39*, 2458-2469.
- [78] H. Shi, X. He, W. Cui, K. Wang, K. Deng, D. Li, F. Xu, *Anal Chim Acta* **2014**, *812*, 138-144.
- [79] F. Darfeuille, S. Reigadas, J. B. Hansen, H. Orum, C. Di Primo, J. J. Toulme, *Biochemistry* **2006**, *45*, 12076-12082.
- [80] a) V. V. Filichev, E. B. Pedersen, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14849-14858; b) I. Geci, V. V. Filichev, E. B. Pedersen, *Bioconjug Chem* **2006**, *17*, 950-957.
- [81] E. B. Pedersen, J. T. Nielsen, C. Nielsen, V. V. Filichev, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, 2470-2481.
- [82] G. Mayer, A. Heckel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 4900-4921.
- [83] A. Heckel, G. Mayer, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 822-823.
- [84] A. Pinto, S. Lennarz, A. Rodrigues-Correia, A. Heckel, C. K. O'Sullivan, G. Mayer, *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 360-366.
- [85] G. Mayer, J. Muller, T. Mack, D. F. Freitag, T. Hover, B. Potzsch, A. Heckel, *Chembiochem* **2009**, *10*, 654-657.
- [86] G. Mayer, A. Lohberger, S. Butzen, M. Pofahl, M. Blind, A. Heckel, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 6561-6564.
- [87] a) A. Heckel, M. C. Buff, M. S. Raddatz, J. Muller, B. Potzsch, G. Mayer, *Angewandte Chemie* **2006**, *45*, 6748-6750; b) M. C. Buff, F. Schafer, B. Wulffen, J. Muller, B. Potzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, 2111-2118.
- [88] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 4422-4437.
- [89] M. Liu, H. Jinmei, H. Abe, Y. Ito, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 2964-2967.
- [90] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angewandte Chemie* **1999**, *38*, 2393-2395.
- [91] Y. Kim, J. A. Phillips, H. Liu, H. Kang, W. Tan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 6489-6494.
- [92] B. C. Lechtenberg, S. M. Freund, J. A. Huntington, *Biol Chem* **2012**, *393*, 889-898.
- [93] H. C. Hemker, S. Beguin, *Thromb Haemost* **1995**, *74*, 134-138.
- [94] E. Di Cera, *Chest* **2003**, *124*, 11S-17S.
- [95] P. S. Gandhi, Z. Chen, E. Appelbaum, F. Zapata, E. Di Cera, *IUBMB Life* **2011**, *63*, 375-382.

- [96] J. H. Griffin, J. A. Fernandez, A. J. Gale, L. O. Mosnier, *J Thromb Haemost* **2007**, *5 Suppl 1*, 73-80.
- [97] G. Mayer, F. Rohrbach, B. Potzsch, J. Muller, *Hamostaseologie* **2011**, *31*, 258-263.
- [98] M. B. Brooks, T. Stokol, J. L. Catalfamo, *Clin Lab Med* **2011**, *31*, 139-159.
- [99] M. T. Stubbs, W. Bode, *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 23-28.
- [100] S. T. Olson, I. Bjork, S. C. Bock, *Trends Cardiovasc Med* **2002**, *12*, 198-205.
- [101] D. A. Lane, H. Philippou, J. A. Huntington, *Blood* **2005**, *106*, 2605-2612.
- [102] H. H. Versteeg, J. W. Heemskerk, M. Levi, P. H. Reitsma, *Physiol Rev* **2013**, *93*, 327-358.
- [103] B. Dahlback, B. O. Villoutreix, *FEBS Lett* **2005**, *579*, 3310-3316.
- [104] M. Riewald, R. J. Petrovan, A. Donner, B. M. Mueller, W. Ruf, *Science* **2002**, *296*, 1880-1882.
- [105] L. Yang, J. S. Bae, C. Manithody, A. R. Rezaie, *J Biol Chem* **2007**, *282*, 25493-25500.
- [106] V. De Filippis, I. Russo, A. Vindigni, E. Di Cera, S. Salmaso, A. Fontana, *Protein Sci* **1999**, *8*, 2213-2217.
- [107] H. Nagashima, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 50439-50444.
- [108] S. M. Desantis, C. Lazaridis, *Intensive Care Med* **2013**.
- [109] L. C. Griffin, G. F. Tidmarsh, L. C. Bock, J. J. Toole, L. L. Leung, *Blood* **1993**, *81*, 3271-3276.
- [110] A. Charles, M. Sadiku, *Fundamentals of Electric Circuits, Vol. 3*, McGraw-Hill, **2006**.
- [111] F. Rohrbach, H. Karadeniz, A. Erdem, M. Famulok, G. Mayer, *Anal Biochem* **2012**, *421*, 454-459.
- [112] P. M. Mannucci, M. Levi, *N Engl J Med* **2007**, *356*, 2301-2311.
- [113] C. E. Chivers, E. Crozat, C. Chu, V. T. Moy, D. J. Sherratt, M. Howarth, *Nat Methods* **2010**, *7*, 391-393.
- [114] a) U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 4918-4925; b) V. V. Filichev, I. V. Astakhova, A. D. Malakhov, V. A. Korshun, E. B. Pedersen, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* **2008**, 347-348.
- [115] M. Paramasivam, S. Cogoi, V. V. Filichev, N. Bomholt, E. B. Pedersen, L. E. Xodo, *Nucleic Acids Res* **2008**, *36*, 3494-3507.
- [116] S. Cogoi, M. Paramasivam, V. Filichev, I. Geci, E. B. Pedersen, L. E. Xodo, *J Med Chem* **2009**, *52*, 564-568.
- [117] a) F. Rohrbach, M. I. Fatthalla, T. Kupper, B. Potzsch, J. Muller, M. Petersen, E. B. Pedersen, G. Mayer, *ChemBiochem* **2012**, *13*, 631-634; b) M. I. Fatthalla, Y. M. Elkholy, N. S. Abbas, A. H. Mandour, P. T. Jorgensen, N. Bomholt, E. B. Pedersen, *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 207-214.
- [118] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564-566.
- [119] A. Pica, I. R. Krauss, A. Merlino, S. Nagatoishi, N. Sugimoto, F. Sica, *FEBS J* **2013**.
- [120] M. Vorlickova, I. Kejnovska, K. Bednarova, D. Renciuik, J. Kypr, *Chirality* **2012**, *24*, 691-698.
- [121] D. M. Gray, J. D. Wen, C. W. Gray, R. Repges, C. Repges, G. Raabe, J. Fleischhauer, *Chirality* **2008**, *20*, 431-440.
- [122] G. Mayer, M. S. Ahmed, A. Dolf, E. Endl, P. A. Knolle, M. Famulok, *Nat Protoc* **2010**, *5*, 1993-2004.

- [123] K. S. Schmidt, S. Borkowski, J. Kurreck, A. W. Stephens, R. Bald, M. Hecht, M. Friebe, L. Dinkelborg, V. A. Erdmann, *Nucleic acids research* **2004**, *32*, 5757-5765.
- [124] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 8735–8738.
- [125] J. Wengel, M. Petersen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, A. E. Hakansson, R. Kumar, M. D. Sorensen, V. K. Rajwanshi, T. Bryld, J. P. Jacobsen, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 389-396.
- [126] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [127] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570-9571.
- [128] a) Y. Li, L. Guo, F. Zhang, Z. Zhang, J. Tang, J. Xie, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2570-2577; b) C. Daniel, F. Melaine, Y. Roupioz, T. Livache, A. Buhot, *Biosens Bioelectron* **2013**, *40*, 186-192.
- [129] A. Rodrigues-Correia, M. B. Koepfel, F. Schafer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal Bioanal Chem* **2011**, *399*, 441-447.
- [130] F. Rohrbach, F. Schafer, M. A. Fichte, F. Pfeiffer, J. Muller, B. Potzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Angewandte Chemie* **2013**.
- [131] R. Schmutzler, H. Furstenberg, *Dtsch Med Wochenschr* **1966**, *91*, 297-303.
- [132] D. T. Mangano, I. C. Tudor, C. Dietzel, *N Engl J Med* **2006**, *354*, 353-365.
- [133] H. Ruhl, J. Muller, U. Harbrecht, R. Fimmers, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, *Thrombosis and haemostasis* **2012**, *107*, 848-853.
- [134] P. H. Lin, R. H. Chen, C. H. Lee, Y. Chang, C. S. Chen, W. Y. Chen, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *88*, 552-558.
- [135] M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 5680-5689.
- [136] F. Lohmann, D. Ackermann, M. Famulok, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 11884-11887.
- [137] Z. Dai, N. G. Dulyaninova, S. Kumar, A. R. Bresnick, D. S. Lawrence, *Chem Biol* **2007**, *14*, 1254-1260.
- [138] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 413-444.
- [139] aA. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2728-2731; bC. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 5950-5953.
- [140] L. Bedouet, H. Adenier, S. Pulvin, C. Bedel-Cloutour, D. Thomas, *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *320*, 939-944.
- [141] a) S. J. Potts, T. D. Johnson, F. A. Voelker, H. Lange, G. D. Young, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2011**, *19*, 494-498; b) B. H. Jun, H. Kang, Y. S. Lee, D. H. Jeong, *Molecules* **2012**, *17*, 2474-2490; c) K. Somers, C. Govarts, P. Stinissen, V. Somers, *Autoimmun Rev* **2009**, *8*, 573-579.
- [142] a) K. E. Brummel-Ziedins, M. F. Whelihan, G. E. Rivard, S. Butenas, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **2011**, *9*, 2262-2267; b) M. G. Elisen, P. A. von dem Borne, B. N. Bouma, J. C. Meijers, *Blood* **1998**, *91*, 1542-1547.
- [143] V. Viglasky, T. Hianik, *Gen Physiol Biophys* **2013**, *32*, 149-172.
- [144] K. W. Thiel, P. H. Giangrande, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 209-222.
- [145] P. J. Bates, D. A. Laber, D. M. Miller, S. D. Thomas, J. O. Trent, *Exp Mol Pathol* **2009**, *86*, 151-164.
- [146] J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki, H. Kasai, *J Physiol* **2011**, *589*, 2447-2457.
- [147] A. Specht, J. S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2006**, *7*, 1690-1695.

- [148] T. Mosmann, *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [149] B. Wulffen, M. C. Buff, M. Pofahl, G. Mayer, A. Heckel, *Photochem Photobiol Sci* **2012**, *11*, 489-492.
- [150] P. Y. Watson, M. J. Fedor, *Nat Struct Mol Biol* **2011**, *18*, 359-363.
- [151] S. Kantevari, G. R. Gordon, B. A. MacVicar, G. C. Ellis-Davies, *Nat Protoc* **2011**, *6*, 327-337.
- [152] K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, E. J. Mathur, *Gene* **1991**, *108*, 1-6.
- [153] R. Sousa, S. Mukherjee, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2003**, *73*, 1-41.
- [154] a) R. A. Blidner, K. R. Svoboda, R. P. Hammer, W. T. Monroe, *Mol Biosyst* **2008**, *4*, 431-440; b) Q. N. Nguyen, R. V. Chavli, J. T. Marques, P. G. Conrad, Jr., D. Wang, W. He, B. E. Belisle, A. Zhang, L. M. Pastor, F. R. Witney, M. Morris, F. Heitz, G. Divita, B. R. Williams, G. K. McMaster, *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 394-403.
- [155] M. G. Theis, A. Knorre, B. Kellersch, J. Moelleken, F. Wieland, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 11221-11226.
- [156] Z. M., M. N., <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold> Rensselaer Polytechnic Institute.
- [157] K. K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghoshian, R. J. Cedergren, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 5764-5768.
- [158] M. R. Stark, J. A. Pleiss, M. Deras, S. A. Scaringe, S. D. Rader, *Rna* **2006**, *12*, 2014-2019.
- [159] R. Rieder, C. Hobartner, R. Micura, *Methods Mol Biol* **2009**, *540*, 15-24.
- [160] D. D. Young, R. A. Garner, J. A. Yoder, A. Deiters, *Chem Commun (Camb)* **2009**, 568-570.
- [161] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281-286.