



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Stabile kovalente Konjugate von Designed Ankyrin
Repeat Proteinen (DARPin)s mit therapeutischen
Oligonukleotiden“

verfasst von

Emilia Tot

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban

Danksagung

Hiermit will ich mich bei Prof. Dr. Ernst Urban für die informativen Seminare und die Möglichkeit der Absolvierung meiner Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Chemie bedanken.

Ein großer Dank gilt Dr. Johannes Winkler für die interessante Themenstellung, die Gelegenheit bei dem Projekt mitzuwirken und die umfangreiche Betreuung.

Besonders bedanken will ich mich auch bei Mag. pharm. Cornelia Lorenzer für die freundliche und zeitintensive Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor und die zahlreichen Tipps.

Herzlich danken möchte ich außerdem meinen Eltern, die mich während der Studienzeit immer unterstützt und mir in jeder Situation geholfen haben, und zuletzt meinem Freund, der mir zur Seite gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Abstract	8
1 Einleitung.....	9
1.1 RNA-Interferenz	9
1.2 SiRNA-basierte Therapie.....	11
1.3 Hürden siRNA-basierter Therapie und mögliche Lösungen	12
1.4 Designed Ankyrin Repeat Proteine (DARPs).....	15
1.5 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM).....	16
2 Ziel.....	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate	18
3.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie.....	22
3.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568.....	24
3.4 Analytik der Konjugate und der synthetisierten Oligonukleotide	26
3.5 Zellkulturtests	30
4 Resultate	34
4.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate	34
4.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie.....	43
4.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568.....	45
4.4 Natives Polyacrylamidgel (10%) zum Nachweis der Duplexbildung...	47
4.5 Zellkulturtests	48

5 Diskussion.....	52
5.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate.....	52
5.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie	54
5.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568	55
5.4 Natives Polyacrylamidgel (10 %) zum Nachweis der Duplexbildung .	56
5.5 Zellkulturtests.....	57
5.6 Konklusion	59
6 Abkürzungen	60
7 Referenzen.....	61
Lebenslauf.....	64

Zusammenfassung

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus des Organismus zur posttranslationalen Genexpressionsregulierung, kann aber auch therapeutisch genutzt werden. SiRNA-basierte Therapeutika sind vor allem in der Behandlung von Krebs, viralen und genetischen Erkrankungen vielversprechende Entwicklungen, die neue Gen-Angriffspunkte bieten. Einige Vertreter befinden sich bereits in klinischer Testung. Allerdings ist die Anwendungsmöglichkeit siRNA-basierter Therapie beschränkt. Es gibt einige Hürden, die es zu überwinden gilt. Dazu gehören unter anderem die kurze Halbwertszeit, Abbau durch Enzyme, hohe renale Clearance und off-target Effekte. Eines der größten Probleme ist die geringe Zellaufnahme. Um diese zu verbessern werden unterschiedliche chemische Modifikationen, Konjugate und Nanopartikel entwickelt.

In dieser Diplomarbeit wurden Konjugate von Designed Ankyrin Repeat Proteinen (DARPs) mit siRNA hergestellt. DARPs sind Proteine, die spezifisch Antigene binden können und Antikörpern in vielen Faktoren überlegen sind. Das EpCAM-spezifische DARPin Ec4-C wurde verwendet. Es bindet selektiv an sein Target EpCAM, ein Membranprotein, das in einigen Krebsformen überexprimiert wird.

Ein Schwerpunkt der Diplomarbeit lag bei der Herstellung dieser Konjugate. Dabei wurden die Reaktionsverläufe und Aufreinigungsschritte mittels HPLC und Gelelektrophorese kontrolliert und optimiert. Eine oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie wurde entwickelt um ein reines Produkt zu erhalten. Dann erfolgten die Analyse der Duplexbildung und einige Zellkulturversuche. Mittels Luciferase-Test wurden die Fähigkeit des Konjugats zum Gen-Silencing und mit der Durchflusszytometrie die Bindung des Targets EpCAM untersucht.

Der Luciferase-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Herunterregulierung des Zielgens durch nackte siRNA oder Konjugat. Allerdings war eindeutig eine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Die Bindung des intakten Konjugats an EpCAM-exprimierende Zellen durch den fluoreszenzmarkierten Gegenstrang konnte mittels Durchflusszytometrie nicht

eindeutig bewiesen werden, wobei die der DARPin-Komponente durch einen entsprechenden sekundären Antikörper festgestellt werden konnte.

Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass DARPin-siRNA Konjugate neue Strategien für eine Target-spezifische RNAi-basierende Therapie ermöglichen könnten.

Abstract

RNA interference is a natural mechanism of an organism for posttranslational regulation of gene expression. It also can be used therapeutically. SiRNA based therapeutics could offer new opportunities for the treatment of various diseases like cancer, viral infections and genetic disorders. Some representatives are already in clinical testing. But their application is limited because of some hurdles. Short half life, degradation through enzymes, high renal clearance and off-target effects are examples for restricting factors. One of the biggest problems is poor cellular uptake. Therefore several chemical modifications, conjugates and nanoparticles are in development.

Conjugates of siRNA with Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin)s were produced during this diploma thesis. DARPin)s are proteins, which can bind antigens specifically, and have important advantages over antibodies. The EpCAM-specific DARPin Ec4-C was used. EpCAM is a transmembrane protein, which is upregulated in diverse forms of cancer.

The preparation of these conjugates was a point of main effort. The reactions and purification steps were controlled with HPLC and gel electrophoresis. Subsequently the processes were optimized. An oligonucleotide based affinity chromatography was developed to gain a pure product. Then analysis of duplex formation and cell culture tests followed. Gene silencing was probed with a Luciferase Reporter Assay. Binding of the target EpCAM was examined with flow cytometry.

Luciferase Reporter Assay showed no significant differences between gene silencing through naked siRNA or conjugate. But it was recognized that the effect was dependent on the used concentration. The attachment to EpCAM could not be proven for the conjugate but for the protein itself by use of flow cytometry.

These results indicate that conjugates of DARPin)s with siRNA could offer new strategies for target specific RNAi based therapy.

1 Einleitung

1.1 RNA-Interferenz

Als RNA-Interferenz, eine Art des post-transkriptionellen Gen-Silencings, wird der biologische Mechanismus der Regulation der Genexpression durch doppelsträngige RNA bezeichnet¹. Gen-Silencing durch RNA wurde erstmals in Pflanzen entdeckt. Während der 1990er wurde das Phänomen in Pilzen, Würmern, Fliegen und Mäusen untersucht. Mittlerweile kann die Expression nahezu jedes Gens durch die Verwendung synthetischer doppelsträngiger RNA (dsRNA) bei vielen Eukaryoten herunterreguliert werden².

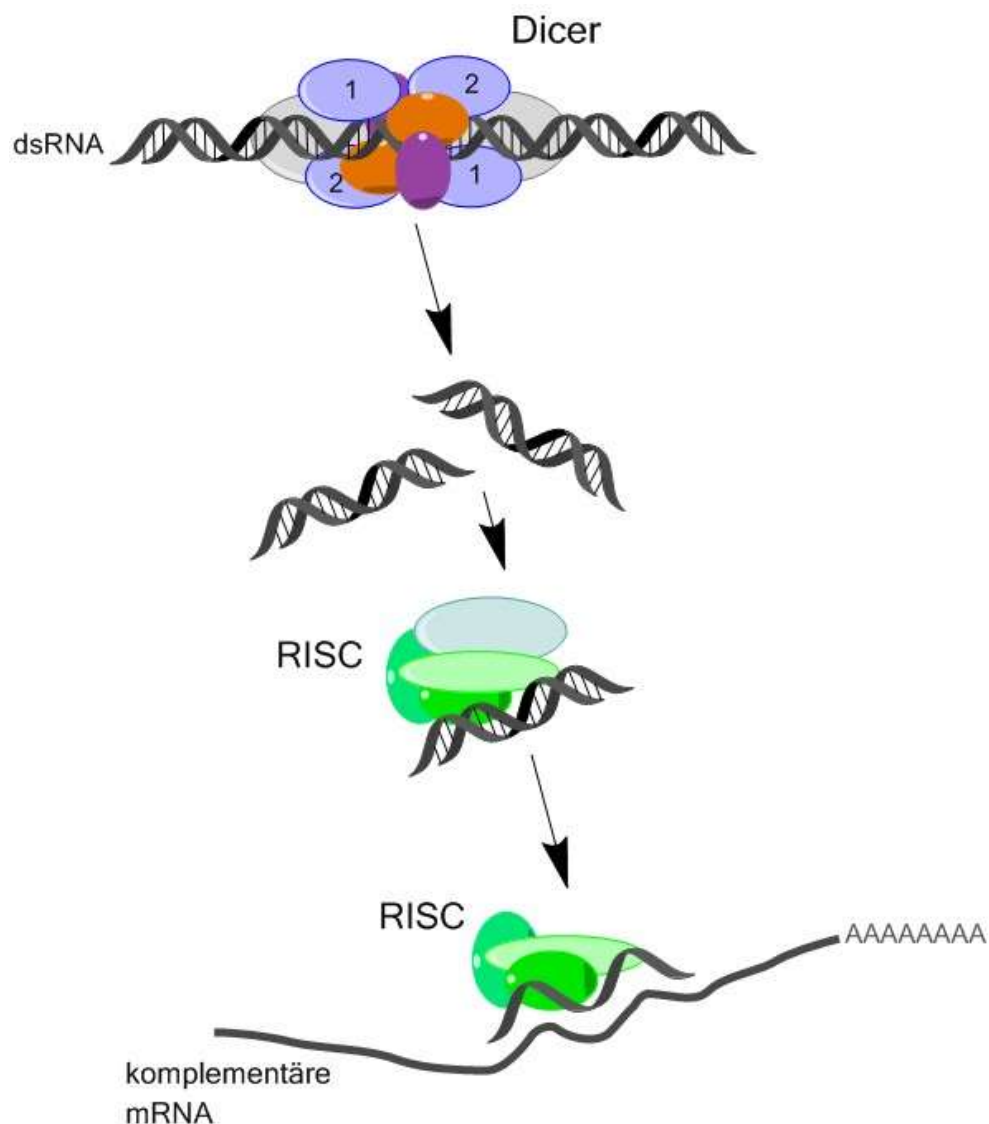


Abbildung 1.01: Mechanismus der RNA-Interferenz. Durch die Fragmentierung der dsRNA durch Dicer wird der Mechanismus eingeleitet. Nach Bildung des RISC kommt es zum spezifischen Gen-Silencing.

Abbildung 1.01 zeigt den RNAi-Mechanismus. Dabei wird lange dsRNA vom Enzym Dicer in kürzere Fragmente von einer Länge von ~21-25 Basenpaaren gespalten³. Dicer gehört zur Familie der Endoribonucleasen, den RNasen III. Diese sind spezifisch für doppelsträngige RNA^{4,6}. Für die Einlagerung in RISC (RNA induced silencing complex) muss die siRNA eine geeignete Länge, eine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende und einen Dinukleotid-Überhang am 3'-Ende aufweisen. SiRNA assoziiert mit einem Argonautenprotein, das neben Dicer und dsRBP (dsRNA-binding domain) Teil des RISCs ist. Dabei wird der „guide strand“ der siRNA gebunden, der nicht mehr benötigte komplementäre „passenger strand“ dissoziiert. Dieser „guide strand“ dient als Anleitung für die sequenzspezifische Unterdrückung der Translation der komplementären Ziel-mRNA⁵.

Neben der RNAi durch siRNA gibt es zwei weitere RNA-Typen, die durch RISC zum Gen-Silencing führen können. Dabei handelt es sich um miRNA (micro-RNA) und shRNA (short hairpin RNA)⁷.

1.2 SiRNA-basierte Therapie

RNAi dient als wissenschaftliche Methode unter anderem der Untersuchung von Aufgaben und Funktionen verschiedener Gene¹. Aber auch das therapeutische Potential von siRNAs zur Behandlung von Krankheiten, insbesondere solchen basierend auf der Expression mutierter Erbinformation oder Überexpression bestimmter Gene, ist sehr vielversprechend⁸. Vor allem für die Therapie genetischer und viraler Erkrankungen sowie Krebs scheinen Therapeutika basierend auf siRNA gut geeignet zu sein^{9,13}. Einige Beispiele für Krankheiten, die mit Hilfe siRNA-basierter Therapeutika behandelt werden könnten, sind altersbedingte Makuladegeneration, Infektionen mit Respiratorischen Synzytial-Viren oder HI-Viren, Hepatitis C und verschiedene Krebsformen¹⁰⁻¹⁴. Mehrere Applikationen befinden sich in klinischer Testung⁹⁻¹⁴.

Bisher werden in der Krebstherapie hauptsächlich cytotoxische Substanzen eingesetzt, die Tumorzellen selten von gesundem Gewebe unterscheiden können. Die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika, die Krebszellen spezifisch erkennen und ihr Wachstum verhindern können, ist daher von großem Interesse. Durch RNAi-basierte Therapeutika wäre es möglich die Expression antiapoptotischer Gene, verschiedener Faktoren, die für Krebszellen überlebenswichtig sind, oder proliferationsfördernder Gene zu inhibieren. Sobald das Zielgen bekannt ist, dauert es nur kurze Zeit um eine potentiell aktive siRNA zu entwickeln. Dieser Prozess zieht sich bei niedermolekularen Arzneistoffen über Jahre¹⁵.

Trotz der vielen theoretischen Vorteile einer siRNA-basierten Therapie gibt es einige limitierende Faktoren, die es zu überwinden gilt. Die größten Probleme stellen Abbau durch Serum-Nukleasen, unzureichende Zellaufnahme und kurze Halbwertszeit durch hohe renale Clearance dar¹⁶.

1.3 Hürden siRNA-basierter Therapie und mögliche Lösungen

Um einen erfolgreichen Transport zu den Zellen überhaupt zu ermöglichen, muss der Abbau der siRNA durch Serum-Nukleasen verhindert werden. Chemische Modifikationen am Rückgrat, den Zuckern oder Basen können die Stabilität erhöhen und vor Nukleaseabbau schützen^{12,17}. Allerdings toleriert der siRNA Mechanismus nur wenige Veränderungen der chemischen Struktur²³.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems erschwert ebenfalls die Anwendung von siRNAs als Therapeutika. Diese kann unter anderem Toll like Rezeptor-mediert (TLR-mediert) sein^{17,18}. Toll like Rezeptoren, die in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind, erkennen siRNA und leiten eine Antwort des Immunsystems ein. Diese führt zur Induktion von Zytokinen wie Interleukinen, Typ I Interferonen und Tumornekrosefaktor α . Ob es zu einer Immunantwort kommt, hängt von der Sequenz, Struktur und Chemie der siRNA und deren Trägermaterialien ab¹⁸.

Sogenannte off-target Effekte bilden eine weitere Hürde. Darunter versteht man die Hybridisierung der siRNA an andere mRNA aufgrund partieller Sequenzhomologie und folgende unerwünschte Effekte^{12,18}. Durch Optimierung der siRNA-Sequenz und Kombination chemischer Modifikationen können off-target Effekte vermieden oder reduziert werden¹⁸.

Eines der Hauptprobleme ist allerdings die unzureichende Zellaufnahme¹⁹.

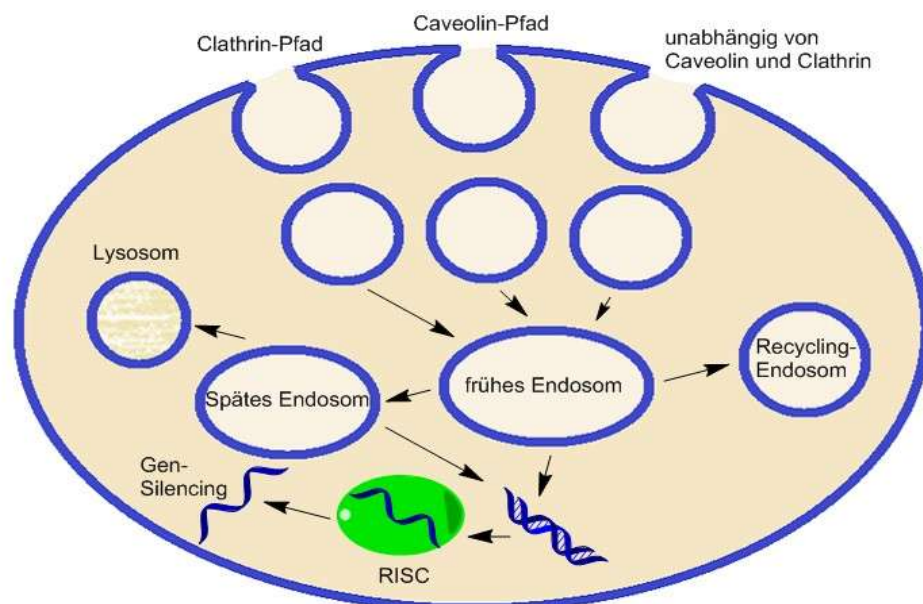


Abbildung 1.02: Endozytose-Wege von Oligonukleotid-Konjugaten. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Aufnahme-Routen der Konjugate.

Nackte siRNA ist aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, ihrer negativen Nettoladung und Hydrophilie nicht in der Lage die Plasmamembran zu überwinden und so in die Zellen zu gelangen^{19,22}. Bestimmte modifizierte RNA und RNA enthaltende Partikel können durch Endozytose von Zellen aufgenommen werden¹⁹. Die Endozytose kann über den Clathrin- oder Caveolin-Pfad oder unabhängig von beiden erfolgen^{20,21,23}. Die Oligonukleotide befinden sich dann in frühen Endosomen und gelangen über sortierende in späte Endosome und anschließend Lysosome, wo sie abgebaut werden. Daher muss siRNA, um das Cytoplasma und somit den Wirkort zu erreichen, die Endosomen verlassen, bevor sie in Lysosomen überführt wird (siehe Abbildung 1.02). Wenn ein Rezeptor an der Zellaufnahme beteiligt war, wird er meist von Liganden dissoziiert und gelangt durch Recycling wieder an die Zelloberfläche^{19,23}. Die Anforderung an ein perfektes Transportsystem ist die optimale Kombination verschiedener Faktoren wie Stabilität, erhöhte Zirkulationszeit, Target-Selektivität, ausreichende Retentionszeit am Zielgewebe und ein akzeptables Sicherheitsprofil²³. Mehrere Strategien durch chemische Modifikation, Konjugation mit geeigneten Molekülen oder Verpackung in Nanopartikel befinden sich in Entwicklung (Beispiele siehe Abbildung 1.03)^{19,21,22}.

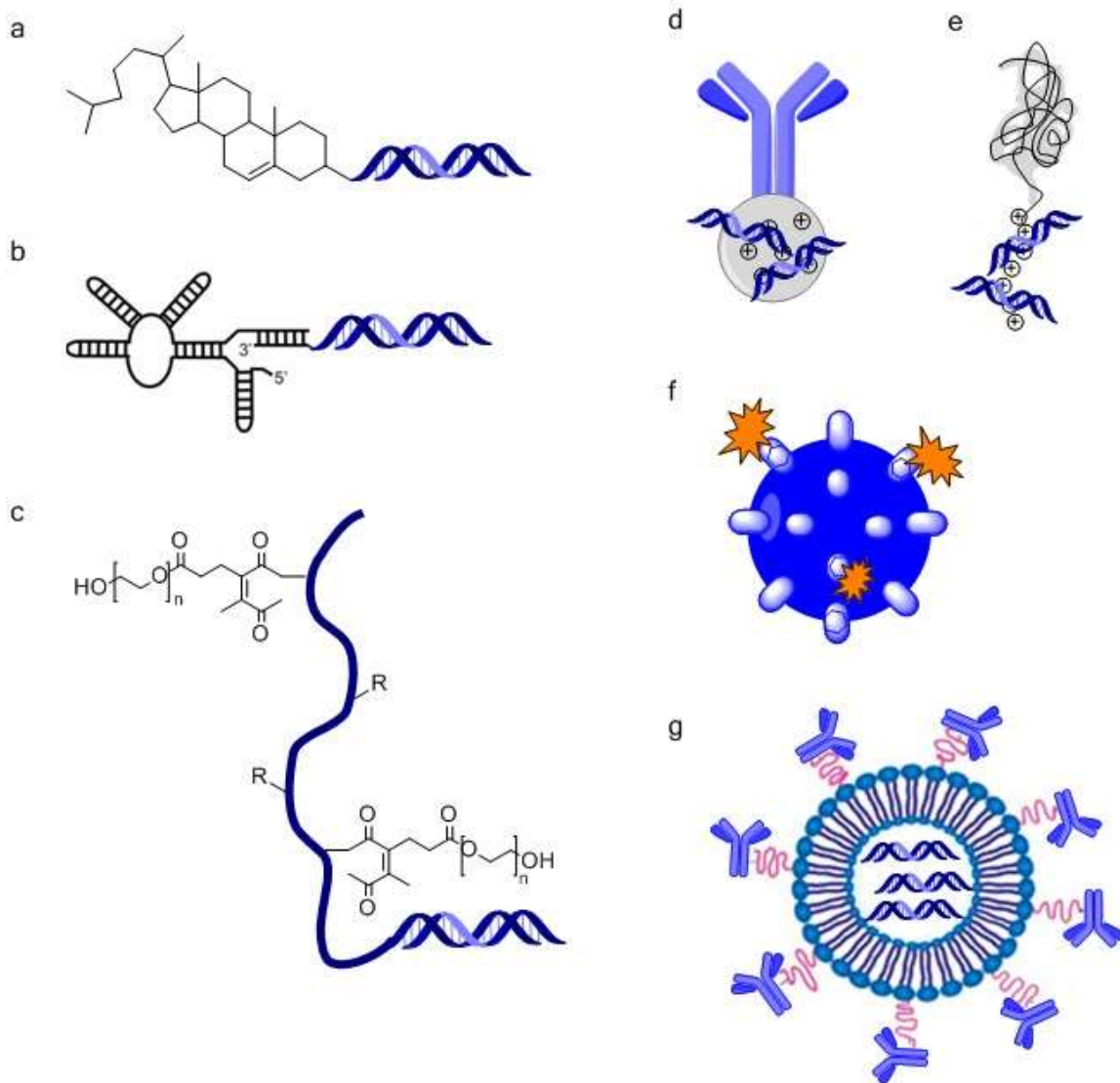


Abbildung 1.03: Schematische Darstellung unterschiedlicher Formen von siRNA-Transportsystemen. **a** siRNA mit kleinen Molekülen wie Cholesterin konjugiert, **b** verbunden mit einem Aptamer, das an Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet oder **c** mit membrandurchdringenden Polymeren, die kleine zielgerichtete Moleküle tragen, **d** komplexiert mit Fusionsproteinen bestehend aus target-spezifischem Peptid oder Antikörper-Fragment mit einer RNA-bindenden Domäne aus Protamin oder **e** Polyarginin, **f** verkapselt in Nanopartikeln oder **g** Liposomen mit zielgerichteten Domänen.

1.4 Designed Ankyrin Repeat Proteine (DARPinS)

DARPinS, die sich von natürlichen Ankyrin Repeat Proteinen ableiten, bilden eine neue Klasse Antigen-bindender Proteine, die so gut wie jedes Zielprotein mit hoher Affinität und Spezifität binden können²⁴. Mit Hilfe von Phagen- oder Ribosom-Display können selektive DARPinS generiert werden. Sie sind Antikörpern, die viele Nachteile wie beispielsweise hohe Produktionskosten, geringe Ausbeuten und schlechte Gewebegängigkeit aufweisen, in vielen Faktoren überlegen. Dazu tragen gute Expressionsausbeuten in *Escherichia coli*, hohe Stabilität und Löslichkeit, leichte Handhabung und das Fehlen von post-translationalen Modifikationen und Cysteinen bei²³⁻²⁶.

Eine sich wiederholende Domäne besteht aus 33 Aminosäuren, die eine Schleife, einen β -Turn und zwei antiparallele α -Helices formen^{25,27}. DARPinS bestehen generell aus je einer C- und N-Cap-Domäne, die zur Stabilisierung beitragen, sowie mehreren, meist drei internen Domänen, die die spezifische Bindung gewährleisten^{24,26}. Für weitere Modifikationen kann durch Protein Engineering am C-Terminus ein Cystein-Molekül eingeführt werden (siehe Abbildung 1.04)^{26,27}.

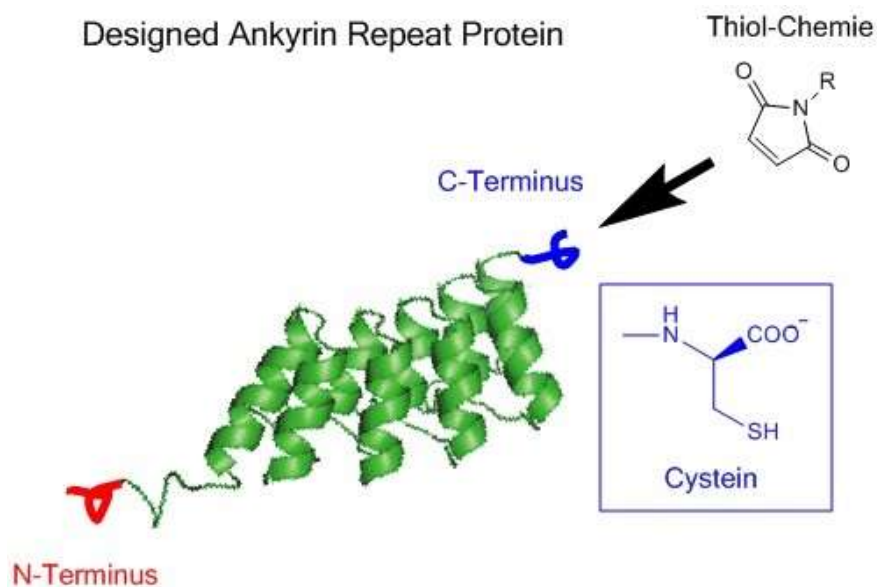


Abbildung 1.04: Vereinfachte Struktur eines DARPinS. Manche DARPinS können am N-Terminus durch sogenannte Click-Chemie verändert werden. Am C-Terminus kann ein Cystein-Molekül angebracht werden, wodurch weitere Modifikationen möglich sind.

EpCAM-spezifische DARPinS wurden entwickelt um gezielt Tumorzellen zu erreichen^{23,26,27}.

1.5 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

EpCAM ist ein 40 kDa schweres glykosyliertes Membranprotein, das in verschiedenen menschlichen Epithelgeweben, Tumor-, Vorläufer- und Stammzellen vorkommt^{28,29}. Es gilt als eines der häufigsten und am stärksten exprimierten bekannten tumor-assoziierten Antigene³⁰. In vivo Expression von EpCAM wird mit erhöhter epithelialer Proliferation und erniedrigter Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht. Die meisten Weichteil-Tumore und alle Lymphome sind EpCAM-negativ, wobei viele solide Tumore, wie unter anderem Kolon-, Rektum-, Prostata-, Leber-, Brust- und Lungenkarzinome, erhöhte EpCAM-Expression aufweisen²⁹.

EpCAM besitzt eine Doppelfunktion als Zelladhensionsmolekül und Rezeptor, der bei der Regulierung der Gentranskription und Zellproliferation beteiligt ist. Die hohe Expressionsrate und proliferationsfördernde Rolle von EpCAM in verschiedenen Krebszellen und auch Krebs-Stammzellen machen es als Target für die Entwicklung neuer Krebs-Therapeutika interessant²⁸.

2 Ziel

Gegenstand dieser Diplomarbeit war die Herstellung kovalenter stabiler Konjugate von DARPins mit siRNA mittels Sulfo-SMCC-Linker und die Optimierung der Reaktionsschritte. Dazu sollte zunächst ein Aminohexyl-modifiziertes einzelsträngiges RNA-Oligonukleotid mit einem NHS-aktivierten Linker umgesetzt werden. Nach Abtrennung des Überschusses des Linkers sollte das Protein über eine Maleimid-Bindung an das Oligonukleotid gebunden werden. Zur Verfolgung der einzelnen Reaktionsschritte war es nötig, geeignete Überwachungsmethoden mittels HPLC und Gelelektrophorese zu entwickeln. Für ein gereinigtes Produkt sollte weiters eine Methode zur Abtrennung der nicht umgesetzten Reaktanden (Oligonukleotid bzw. Protein) entwickelt werden.

Nach Erhalt des Zielmoleküls sollte in Zellkulturmodellen die Fähigkeit zur Bindung des Targets EpCAM und das Ausmaß der Herunterregulierung des Zielgens verglichen mit nackter siRNA mit und ohne Transfektionsreagens untersucht werden. Die Evaluierung der Genexpression sollte in einem Luciferase-Reporter Experiment mit einer entsprechenden komplementären siRNA untersucht werden.

3 Material und Methoden

Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Acros, Gibco, Serva, Sigma-Aldrich, Fluka und PAA bezogen. Das Nano-Drop-Spektrophotometer ND-1000 von Peqlab Biotechnologie GmbH wurde für die Konzentrationsbestimmungen verschiedener Oligonukleotide verwendet. Dafür wurde das Lambert-Beersche Gesetz mit dem auf Grund der Sequenz errechneten Extinktionskoeffizienten verwendet.

3.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate

Die 3'-Amino-Oligonukleotide wurden von GlaxoSmithKline (GSK) hergestellt. Bei den verwendeten Oligonukleotiden handelte es sich um Anti-Luciferase siRNA Sensestrang und Anti-Luciferase Negativkontrolle siRNA Sensestrang.

siRNA	Sequenz
Anti-Luciferase Sensestrang	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA-PS-dT-PS-dT-3'
Anti-Luciferase Negativkontrolle Sensestrang	5'-AUCGUACGUACCGUCGUAU-PS-dT-PS-dT-3'

Tabelle 3.01: Sequenzen der für die Konjugatherstellung verwendeten siRNAs. Blau markierte Nukleotide sind 2'-O-methyliert. Die Abkürzung PS beschreibt das Phosphorthioatrückgrat.

Sulfo-SMCC, das wasserlösliche Analogon zu SMCC, stammte von Thermo Scientific Pierce.

3.1.1 Bindung des Sulfo-SMCC-Linkers an das 3'-Amino-Oligonukleotid

80 nmol 3'-Amino-Oligonukleotid wurden in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration betrug ungefähr 1 mM. Ein zehnfacher Überschuss (800 nmol; 80 µl) an Sulfo-SMCC in Form einer 10 mM Lösung wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit 157 µl 100 mM PBS-Puffer pH 7,7 versetzt, sodass die Reaktion bei einer Endkonzentration von 50 mM PBS pH 7,7 ablief. Das Probengefäß wurde bei 25 °C und 350 rpm am Thermo-Mixer geschüttelt. Nach 4-6 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen.

3.1.2 Gelfiltration mit Sephadex G25

Das Reaktionsgemisch wurde auf die stationäre Phase Sephadex G25 in einer 4 ml Säule aufgetragen. Durch diese Größenausschlusschromatographie konnte der Sulfo-SMCC-Überschuss abgetrennt werden. Mit RNase-freiem Wasser wurde in Fraktionen von jeweils 200 µl eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Nano-Drop-Spektrophotometer bei 260 nm vermessen. Die Oligonukleotid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und auf ein geeignetes Volumen mittels Speedvac eingengt.

3.1.3 Proteinreduktion und Gelfiltration mit Sephadex G50

Das DARPin Ec4-C wurde in Escherichia coli BL21 CodonPlus mittels rekombinanter Proteinsynthese hergestellt und unter nativen Bedingungen mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

347,8 µl einer Lösung des DARPins (Konzentration: 5,42 µg/µl; → 100 nmol) wurden mit 14,5 µl einer frisch bereiteten 250 mM DTT-Lösung versetzt. Die DTT-Endkonzentration betrug 10 mM. Das Gemisch wurde bei 37 °C und 350 rpm 30 Minuten lang am Thermo-Mixer geschüttelt. Dann erfolgte die Gelfiltration mit der stationären Phase Sephadex G50. Eluiert wurde in Fraktionen von je 250 µl mit bidestilliertem Wasser. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Nano-Drop-Spektrophotometer bei 280 nm vermessen. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Speedvac auf ein geeignetes Volumen eingengt.

3.1.4 Konjugation des SMCC-Oligonukleotids mit reduziertem DARPin

Das Verhältnis von SMCC-Oligonukleotid zu Ec4-C während der Konjugationsreaktion betrug 1,1:1. 63,3 µl Oligonukleotid-Lösung (20 nmol bezogen auf SMCC-Oligonukleotid; insgesamt 54 nmol Oligonukleotid) wurden mit 40,9 µl Protein-Lösung (18,18 nmol) vermischt und mit 104,2 µl 100 mM PBS pH 7,1-7,4 versetzt. Die Reaktion wurde somit in 50 mM PBS-Puffer pH 7,1-7,4 ablaufen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C und 350 rpm unter Argon auf dem Thermo-Mixer geschüttelt. Nach ungefähr 26 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktion beendet und aufgearbeitet.

3.1.5 Aufreinigung des Konjugats über Ni-NTA-Agarose

Ni-NTA-Agarose stammte von Qiagen. Dabei handelt es sich um eine Affinitätschromatographie-Matrix, die His-tag modifizierte Proteine binden kann. Dadurch war es möglich überschüssiges Oligonukleotid aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Laut Vorschrift konnte 1 µl Ni-NTA-Agarose 2 µg Protein binden.

Die entsprechende Menge (172 µl) Ni-NTA-Agarose wurde zum Gemisch pipettiert. Die Mischung wurde 30 Minuten lang bei 25 °C und 650 rpm am Thermo-Mixer geschüttelt. Dann wurde sie in ein Zentrifugal-Säulchen (20 µm Receiver Columns von Macherey-Nagel) übergeführt, zentrifugiert und ca. 5 Mal mit 100 mM Tris gewaschen um die Oligonukleotidfraktionen abzutrennen. Konjugat und überschüssiges DARPin wurden durch Elution in Fraktionen von 30-100 µl mit 250 mM Imidazol erhalten. Die Fraktionen wurden mittels Nano-Drop-Spektrophotometer bei 280 nm und 260 nm vermessen. Jene, die Konjugat enthielten, wurden vereinigt.

3.1.6 Aufreinigung des Konjugats mittels oligonukleotidbasierter Affinitätschromatographie

Mit dieser Methode sollte überschüssiges Protein entfernt werden. Da der pH-Wert der Mischung bei 9-10 lag, wurde mittels Amicon Zentrifugalfilter (Amicon Ultra 0,5 ml von Sigma-Aldrich) und 36,3 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM pH 7,1-7,4 umgepuffert. Danach betrug der pH-Wert des Gemischs 7,4-7,7. Die Mischung (4,1 nmol; 90 μ l) wurde zur vorbereiteten Affinitätschromatographie-Matrix (siehe Punkt 3.2) in das Zentrifugal-Säulchen pipettiert. Ungefähr 15 Minuten lang wurde bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde ein Mal mit 36,3 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM gewaschen und anschließend mit abnehmender Salzkonzentration eluiert. Dazu wurden 3 Mal 3,6 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 50 mM, 9 Mal 1,8 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 25 mM und zuletzt 2 Mal 0,9 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 12,5 mM verwendet. Diese wurden aus 100 mM PBS mit einer NaCl-Konzentration von 1379 mM und RNase-freiem Wasser hergestellt. Die 14 Eluate zu je 30 μ l wurden mittels Nano-Drop-Spektrophotometer vermessen. Die Konjugat enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon Zentrifugalfilter aufkonzentriert.

3.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie

Streptavidin-Sepharose, die als Matrix für die oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie fungierte, wurde von GE Healthcare bezogen.

3.2.1 Biotin-DNA-Synthese

Sequenz der synthetisierten DNA: Biotin-**AGCATCAGTCGCGTAAG**

Die Synthese des komplementären Strangs zum Oligonukleotid Anti-Luciferase siRNA Sensestrang erfolgte mit Hilfe der Phosphoramidit-Methode (Hauptschritte: Detritylierung, Kopplung, Capping und Oxidation) durch den Poly Gen Synthesizer mit Standardreagenzien³¹. Ein 7mer des komplementären Strangs (blau markiert) wurde mit einem Linker (orange markiert) synthetisiert um eine Hinderung der Duplexbildung durch eine ungünstige stereochemische Lage zu vermeiden. Zuletzt wurde das Oligonukleotid am 5'-Ende mit einem entsprechenden Phosphoramiditbaustein biotinyliert. Dieser gesamte Prozess wurde vollautomatisch mittels Poly Gen Synthesizer durchgeführt.

3.2.2 Biotin-DNA-Entschützung und -Aufreinigung

Das Trägermaterial der Synthese wurde in ein Vial übergeführt, 1 ml Ammoniumhydroxid zugegeben, und bei 65 °C über Nacht stehen gelassen. Nach Abkühlen wurde der Überstand entfernt und in ein neues, steriles Eppendorfgefäß gegeben. Zwei Mal wurde das Trägermaterial mit 100 µl RNase-freiem Wasser gewaschen, das anschließend zum Überstand hinzugefügt wurde. Das Volumen wurde mittels Speedvac reduziert. Da ein Niederschlag zu erkennen war, wurde dieser abzentrifugiert und der Überstand erneut in ein Eppendorfgefäß übergeführt. Dieser Überstand wurde mit 10 µl 3 M Natriumacetat in RNase-freiem Wasser versetzt. Dann wurde gevortext und 1 ml 2-Propanol hinzugefügt. Erneut wurde 30 Sekunden lang gevortext. Die Mischung wurde zwei Stunden lang bei -70 °C stehen gelassen.

Das Gemisch wurde 10 Minuten lang bei 12500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde mit 750 µl 75 % Ethanol versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde 10 Minuten lang luftgetrocknet um Ethanolreste zu entfernen. Dann wurde es in 250 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration mittels Nano-Drop-Spektrophotometer bestimmt.

3.2.3 Bindung der Biotin-DNA an Streptavidin-Sepharose

Mit einem Überschuss an Streptavidin-Sepharose wurde gearbeitet um eine vollständige Bindung der biotinylierten DNA zu erzielen. 100 µl Streptavidin-Sepharose wurden zuerst in ein Zentrifugal-Säulchen (20 µm Receiver Columns von Macherey-Nagel) pipettiert und zwei Mal mit je 500 µl 20 mM PBS gewaschen und mittels einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 10 nmol des Biotin-Oligonukleotids wurden mit 100 mM PBS gepuffert, sodass eine Endkonzentration von 20 mM PBS erreicht wurde, und in das Zentrifugal-Säulchen übergeführt. Nach ungefähr 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert und ein paar Mal mit 20 mM PBS gewaschen um die Fehlsequenzen, die durch die Synthese oder unzureichende Entschützung entstanden waren, zu entfernen.

3.2.4 Duplexbildung des Konjugats und Elution

Die aufzutragende Lösung (4,1 nmol; 90 µl) war mit einem 36,3 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM gepuffert. Nach Auftragen auf die stationäre Phase wurde ungefähr 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, ein Mal mit 36,3 mM PBS gewaschen und mit abnehmender Salzkonzentration eluiert. Dazu wurden 3 Mal 3,6 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 50 mM, 9 Mal 1,8 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 25 mM und zuletzt 2 Mal 0,9 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 12,5 mM verwendet. 14 Fraktionen zu je 30 µl wurden erhalten. Die Konjugat enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon Zentrifugalfilter aufkonzentriert. Diese Methode wurde entwickelt um überschüssiges Protein von Konjugat zu trennen.

3.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568

Das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid diente weiteren analytischen Untersuchungen der hergestellten Konjugate. Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 568 stammte von Life Technologies.

3.3.1 Synthese der RNA 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang

Die Synthese des Oligonukleotids Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang mit der Sequenz 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAG-dT-PS-dT-3' erfolgte mit Amino-On-CPG-Harz, um den 3'-Aminohexyl-Rest zu gewährleisten, mittels Poly Gen Synthesizer mit Hilfe der Phosphoramidit-Methode^{31,32}. Die Aminogruppe war notwendig für die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs.

3.3.2 Entschützung und Aufreinigung der synthetisierten RNA

Das Trägermaterial der Synthese wurde in ein Vial übergeführt, 1 ml AMA zugegeben, und eine Stunde lang auf 65 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Überstand entfernt und in ein neues, steriles Eppendorfgefäß übergeführt. Das Trägermaterial wurde zwei Mal mit 100 µl RNase-freiem Wasser gewaschen, das anschließend zum Überstand hinzugefügt wurde. Das Lösungsmittel wurde mittels Speedvac entfernt. Die 2'-Entschützung erfolgte durch Lösen des Oligonukleotids in 50 µl wasserfreiem DMSO, Hinzufügen von 50 µl TEA*3HF, Vortexen und 2,5 Stunden langes Schütteln am Thermo-Mixer bei 65 °C. Nach kurzem Abkühlen im Kühlschrank wurde das Gemisch mit 2 µl 3 M Natriumacetatlösung in RNase-freiem Wasser versetzt und gevortext. Mit 2-Propanol wurde das Eppendorfgefäß aufgefüllt, 30 Sekunden lang gevortext und bei -70 °C 2 Stunden lang gekühlt. Dann wurde die Mischung 10 Minuten lang bei 4 °C und 12500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Zum Pellet wurden 750 µl eiskaltes 75 % Ethanol pipettiert. Anschließend wurde gevortext und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde 10 Minuten lang luftgetrocknet um Ethanolreste zu entfernen. Danach wurde es in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration mittels Nano-Drop-Spektrophotometer bestimmt.

3.3.3 Dialyse der synthetisierten und aufgereinigten RNA

Die Lösung des Oligonukleotids wurde in eine Dialysekassette übergeführt und gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde zwei Mal gewechselt. Das Lösungsmittel wurde mittels Speedvac entfernt und die RNA erneut in 9 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde mittels Nano-Drop-Spektrophotometer bestimmt.

3.3.4 Markierung des synthetisierten Oligonukleotids mit Alexa Fluor® 568

Um weitere Untersuchungen des Konjugats zu ermöglichen sollte das synthetisierte und aufgereinigte Oligonukleotid 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 568 markiert werden.

Ein mg Alexa Fluor® 568 wurde in 56 µl DMSO gelöst. Davon wurden Aliquots zu je 7 µl vorbereitet und bei -20 °C gelagert. Eines wurde für die folgende Reaktion verwendet.

Der Natriumtetraboratpuffer wurde durch Lösen von 0,38 g Natriumtetraborat-Decahydrat in 10 ml bidestilliertem Wasser hergestellt. Mit 6 N Salzsäure wurde der pH-Wert auf 8,5 eingestellt.

Zu 7 µl Alexa Fluor® 568-Lösung wurden 2,81 µl bidest. Wasser, 37,5 µl Natriumtetraboratpuffer pH 8,5 und 2,69 µl (=7,3 nmol) 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 24 °C über Nacht inkubiert.

3.3.5 Fällung des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids mit Ethanol

Das Gemisch wurde mit 5 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und ungefähr 350 µl kaltem 96 % Ethanol versetzt. Es wurde gut durchmischt und bei -70 °C 6 Stunden lang stehen gelassen. Die Lösung wurde bei 4 °C und 12000 rpm 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zwei Mal mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde es kurz getrocknet um Ethanolreste zu entfernen und in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Durch diese Methode sollte freier unreaktierter Fluoreszenzfarbstoff entfernt werden.

Mittels Nano-Drop-Spektrophotometer wurden Messungen bei 578 nm und 260 nm durchgeführt um das Ausmaß der Fluoreszenzmarkierung zu bestimmen.

3.4 Analytik der Konjugate und der synthetisierten Oligonukleotide

3.4.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Analysen mittels HPLC wurden mit dem Gerät Shimadzu Prominence und der Software Shimadzu LC solution durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Clarity 5u Oligo RP18-Säule von Phenomenex. Sie wurde auf 25 °C temperiert. Die Flussrate lag bei 1 ml/min. Die mobile Phase A war eine 50 mM Triethylammoniumacetat-Lösung. Bei der mobilen Phase B handelte es sich um Acetonitril. Detektiert wurde mittels UV-Detektor des HPLC-Gerätes bei 260 nm. Zur Analyse der Proben wurden zwei verschiedene Methoden der Gradientenelution verwendet.

Methode A: 8-30 % ACN			Methode B: 8-60 % ACN		
Zeit (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)	Zeit (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	92	8	0	92	8
30	70	30	60	40	60
32	35	65	60,1	35	65
34	92	8	62	92	8
37	Stop		67	Stop	

Tabelle 3.02: HPLC-Methoden. **Methode A** diente der Analyse und Überwachung der Reaktion zwischen 3'-Amino-Oligonukleotid und Sulfo-SMCC-Linker. **Methode B** wurde bei der Überwachung der Reaktion zwischen SMCC-Oligonukleotid und DARPin, den weiteren Analysen nach verschiedenen Aufreinigungsschritten der Konjugate, sowie bei der qualitativen Analyse der synthetisierten Biotin-DNA eingesetzt.

3.4.2 Gelelektrophorese

3.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgel (12%)

Mit Hilfe dieser Gelelektrophorese konnten Proteine und somit auch die Konjugate analysiert werden. Zur Herstellung von zwei Gelen wurden für das Trenngel in einem Becherglas 3,44 ml bidest. Wasser, 2,50 ml 4x Trennpuffer (1,5 M Tris-HCl, SDS, pH 8,8), 4 ml 30 % Acrylamid-Lösung, 50 µl 10 % APS und 6,67 µl TEMED vereinigt und mit einer Pipette in die vorbereitete Apparatur gegossen. Diese wurde dann mit Butanol aufgefüllt, welches nach Polymerisation des Gels wieder entfernt wurde.

Für das Sammelgel wurden 2,46 ml bidest. Wasser, 1 ml 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 20 % SDS), 0,536 ml 30 % Acrylamid-Lösung, 20 µl 10 % APS und 4 µl TEMED vermengt und auf die zwei vorbereiteten Trenngele gegossen. Mit einem Kamm wurden Taschen geformt.

5 µg bezogen auf Protein (ungefähr 10 µl) wurden pro aufzutragender Probe entnommen und mit Lämmli-Puffer (2 % SDS, 60 mM Tris-Cl, 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau in Wasser) auf 20 µl aufgefüllt. Drei Minuten lang wurde auf 95 °C erhitzt. Dann wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Als Standard fungierte PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), wovon 2 µl aufgetragen wurden. Als Puffer wurden 1 x Kathodenpuffer innen und 1 x Anodenpuffer außen verwendet. Das Gel wurde bei einer Spannung von 150 V ungefähr eine Stunde lang laufen gelassen.

Die Färbung erfolgte eine halbe Stunde lang durch eine Coomassie-Lösung (0,1 % Coomassie-Blue, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % bidest. Wasser), worauf die Entfärbung mit Coomassie-Destaining-Solution (10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % bidest. Wasser) folgte. Zur Dokumentation wurde das Gel mittels GS-710 Calibrated Imaging Densitometer von Bio-Rad fotografiert und mit der Software Quantity One 4.6.3 von Bio-Rad bearbeitet.

3.4.2.2 Harnstoff-Polyacrylamidgel (20%)

Dieses Gel diente der Analyse der synthetisierten 3'-Amino-RNA. Dazu wurden 6,8 g Harnstoff, 7,5 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung (29:1 Acrylamid:Bis-Acrylamid) und 1,5 ml 10 x TBE (890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH ~ 8,3) in einem Erlenmeyerkolben vermengt und zum Lösen des Harnstoffs kurz in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen wurden 7,5 µl TEMED und 75 µl APS hinzugefügt und das Gel in die Apparatur gegossen. Die Taschen wurden mit einem Kamm geformt.

Nach der Polymerisation wurde das leere Gel für einen Vorlauf für 30 Minuten bei 150 V laufen gelassen. Als Puffer wurde 1 x TBE eingesetzt.

Je 1 nmol der Oligonukleotidlösungen wurde mit 10 µl Samplepuffer (Formamidpuffer) gemischt und 3 Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben sofort in die Taschen pipettiert. Außerdem wurden 5 µl einer Standardlösung (mit Xylen-Cyanol und Bromphenolblau) aufgetragen. Das Gel wurde bei 150 V laufen gelassen bis Bromphenolblau ungefähr 2/3 der Gelstrecke erreicht hatte.

Das Gel wurde auf eine DC-Platte mit Fluoreszenzindikator und Parafilm gelegt und unter einer UV-Lampe betrachtet. Durch Fluoreszenzlöschung waren die Oligonukleotidbanden schon ohne Färbung erkennbar.

Gefärbt wurde das Gel mit einer 0,02 % Methylenblaulösung (in TBE) ungefähr eine halbe Stunde lang. Dann wurde durch Waschen mit Wasser entfärbt. Mittels GS-710 Calibrated Imaging Densitometer von Bio-Rad wurde ein Foto zur Dokumentation aufgenommen und mit Hilfe der Software Quantity One 4.6.3 von Bio-Rad bearbeitet.

3.4.2.3 Natives Polyacrylamidgel (10%) zum Nachweis der Duplexbildung

Mit Hilfe dieses nativen Gels sollte die Duplexbildung zwischen Konjugat und fluoreszenzmarkiertem Antisense-Strang nachgewiesen werden. Zuerst wurde das Gel vorbereitet. In einem Becherglas wurden 1,875 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung, 0,75 ml 10 x TBE, 4,7 ml bidest. Wasser, 10 µl TEMED und 100 µl APS vermengt und in die Apparatur gegossen. Dann erfolgte der Vorlauf des leeren Gels für eine halbe Stunde bei 150 V auf Eis.

Die Proben wurden vorbereitet. Dazu wurden je 100 pmol des Anti-Luciferase siRNA Sensestrang-SMCC-Ec4-C-Konjugats und des 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Sensestrangs mit je 100 pmol des fluoreszenzmarkierten Antisensestrangs (siehe Punkt 3.3) versetzt. 10 Minuten lang wurde inkubiert. Als Vergleich wurden noch 100 pmol fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid ohne komplementären Strang in ein Eppendorfgefäß übergeführt. Der Ladepuffer setzte sich aus 140 µl bidest. Wasser und 60 µl 80 % Glycerol zusammen. Mit diesem wurden die Proben auf je 15 µl aufgefüllt. Als Standard wurde DNA loading dye (mit Bromphenolblau) verwendet. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Dieses wurde dann bei 150 V so lange auf Eis laufen gelassen bis der Standard 2/3 der Gelstrecke erreicht hatte.

Das Gel wurde in den Ettan DIGE Imager von GE Healthcare gelegt. Dann erfolgte die Fluoreszenzanregung bei der Channel Dye-Einstellung Cy3 und einer Belichtungszeit von 0,05 Sekunden. Mit der zugehörigen Software konnte das Gel dokumentiert und die Intensität der Banden bestimmt werden.

3.5 Zellkulturtests

3.5.1 Luciferase-Test

Die Zellkulturmedien stammten von Gibco und PAA. Die weißen 96-Well-Platten wurden von Greiner Bio-One, Lipofectamin RNAiMAX-Reagens von Life Technologies, Passiver Lysepuffer und Luciferase Assay Reagens II (bestehend aus Luciferase Assay Substrate in Luciferase Assay Buffer II) von Promega bezogen. Die Messungen wurden mittels Tecan infinite M200Pro und der Tecan i-control 1.7 Software durchgeführt.

3.5.1.1 Herstellung der Transfektionslösungen

Zur Durchführung der Luciferase-Tests wurde durch Versetzen eines Aliquots des Konjugats mit Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang und Inkubation für ungefähr 15 Minuten die Duplexbildung eingeleitet. Diese Lösung wurde dann mit Optimem auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Sie diente als Stammlösung für weitere Verdünnungen. Auch von Anti-Luciferase siRNA Duplex wurde die gewünschte Anzahl von Lösungen verschiedener Konzentrationen mit und ohne Lipofectamin RNAiMAX hergestellt. Pro pmol siRNA wurden 0,3 µl Lipofectamin RNAiMAX, wie laut Herstellerangaben empfohlen, verwendet. Verdünnt wurde immer mit Optimem. Nach einem zuvor erstellten Pipettierplan wurden je 10 µl der Lösungen pro Well in Triplikaten in die Wells übergeführt. In jene Wells für unbehandelte Zellen wurden je 10 µl Optimem pipettiert.

3.5.1.2 Vorbereitung und Aussäen der Zellen

Die Zelllinien HeLa und SW 480, die beide mit Luciferase-Plasmid ausgestattet waren, sich aber im Ausmaß der EpCAM-Expression unterschieden (SW 480-Zellen exprimieren signifikant mehr als HeLa), wurden für den Zellkulturtest vorbereitet. Dazu wurden sie auf 275 000 Zellen pro ml verdünnt. 90 µl Zellsuspension und somit ungefähr 25 000 Zellen wurden pro Well mit bereits vorgelegtem Transfektionsmix bzw. Konjugat ausgebracht. Die Mikrotiterplatte wurde 2 Tage lang bei 37 °C inkubiert.

3.5.1.3 Zellyse

Die Flüssigkeiten in den Wells wurden abgesaugt. Je 50 µl PBS wurden in die Wells pipettiert und wieder entfernt um die Zellen zu waschen. Es folgte die Zellyse mit 20 µl 1 x passiver Lysepuffer pro Well. Nach Zugabe des Lysepuffers wurde die Platte bei Raumtemperatur ungefähr 30 Minuten lang geschüttelt.

3.5.1.4 Bradford Assay

Um die Proteinmengen in den Wells zu bestimmen wurde ein Bradford Assay durchgeführt. Dadurch sollten zu hohe Schwankungen der Werte des Luciferase-Tests durch unterschiedliche Zellzahlen korrigiert werden.

Dazu wurde eine durchsichtige 96-Well-Platte verwendet. Für die Kalibrierungskurve wurden je 0, 2, 5 und 10 µl BSA (1 mg Protein/ml) in Duplikaten in die freien Wells pipettiert und mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Von den Zellysaten wurde je 1 µl pro Well verwendet und ebenfalls in der durchsichtigen Mikrotiterplatte auf 20 µl mit bidest. Wasser aufgefüllt. Zuletzt wurden je 180 µl Bradford Reagens von Bio-Rad zu jeder Probe hinzugefügt. Die Messung erfolgte mittels Tecan-Scanner bei 595 nm.

3.5.1.5 Messung der Lumineszenz

Für die Lumineszenzmessung wurde LAR II und der Tecan-Scanner benötigt. Mittels Injektor erfolgte die Reagenzugabe von 50 µl pro Well und daraufhin sofort die Messung mittels Tecan-Scanner.

3.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, wurde durchgeführt um die Bindung des Konjugats an MDA-MB 468-Zellen zu untersuchen. Damit der Effekt sichtbar wurde, wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Antisensestrang (siehe Punkt 3.3) und einem fluoreszierenden Antikörper (Penta His Tag Antibody) gearbeitet. Dieser Antikörper sollte an Ec4-C binden und so eine Bindung des DARPin an die Zellen sichtbar machen. So konnten durch den Penta His Tag AB die Bindung des Proteins und durch den Alexa Fluor® 568-Antisensestrang die Bindung des gesamten Konjugats untersucht werden. Bei dem Gerät handelte es sich um ein FACScalibur von BD Biosciences.

3.5.2.1 Herstellung der Duplexe

Für den FACS-Versuch war die Duplexbildung des Konjugats Ec4-C-Anti-Luciferase siRNA Sensestrang notwendig. Dazu wurden 100 pmol Konjugat mit 100 pmol Antisensestrang und weitere 100 pmol Konjugat mit 100 pmol fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang (siehe Punkt 3.3) versetzt. Außerdem wurden zu Vergleichszwecken 100 pmol 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Sensestrang mit 100 pmol fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang gemischt. Die Mischungen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

3.5.2.2 Vorbereitung der MDA-MB 468-Zellen

Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Dann wurden sie erneut in Medium aufgenommen, gezählt und 5 Minuten lang bei 37 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 x PBS (mit 1 % FCS) resuspendiert, sodass eine Zellzahl von 1 200 000/ml erreicht wurde.

3.5.2.3 Vorbereitung der Proben mit Penta His Tag Antikörper

Vier Proben wurden für die Durchflusszytometrie mit fluoreszierendem Antikörper vorbereitet.

Proben mit Penta His Tag Antikörper
100 pmol Konjugat (Duplex)
100 pmol Ec4-C
Penta His Tag Antikörper ohne Zusatz
Unbehandelte Zellen ohne Penta HisTag Antikörper

Tabelle 3.03: Proben mit Penta His Tag Antikörper. Diese Proben wurden für den FACS-Versuch mit fluoreszierendem Antikörper vorbereitet um die Bindung des DARPins nachzuweisen.

In vier Eppendorfgefäße wurden je 150 µl Zellsuspension (entsprachen ungefähr 180 000 Zellen) eingebracht. 100 pmol Konjugat (Duplex) wurden in eines davon gegeben, in ein anderes 100 pmol reduziertes Ec4-C. Die Eppendorfgefäße wurden zur Inkubation eine Stunde lang auf Eis gelagert. Dann wurde jedes mit je 1 ml kaltem 1 x PBS (mit 1 % FCS) gewaschen und 10 Minuten lang bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Waschvorgang wiederholt.

Dann wurden die Zellen in je 200 µl eiskaltem 1 x PBS (mit 1 % FCS) resuspendiert. Je 2 µl (~1:100) des Penta His Tag Antikörpers wurden den Proben, außer der Probe mit den unbehandelten Zellen, zugesetzt. Die Mischungen wurden wieder eine Stunde lang auf Eis gelagert. Zwei Waschvorgänge mit je 1 ml 1 x PBS (mit 1 % FCS) folgten. Zuletzt wurden die Zellen in je 500 µl eiskaltem 1 x PBS (mit 1 % FCS) resuspendiert, in FACS-Röhrchen übergeführt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

3.5.2.4 Vorbereitung der Proben mit Alexa Fluor® 568-Antisensestrang

Ebenfalls vier Proben wurden mit Alexa Fluor® 568-Antisensestrang vorbereitet.

Proben mit Alexa Fluor® 568-Antisensestrang
100 pmol Konjugat (Duplex mit fluoreszenzmarkiertem AS-Strang)
100 pmol siRNA (Duplex mit fluoreszenzmarkiertem AS-Strang)
100 pmol Alexa Fluor® 568-Antisensestrang ohne Zusatz
Unbehandelte Zellen ohne Alexa Fluor® 568-Antisensestrang

Tabelle 3.04: Proben mit Alexa-Fluor® 568-Antisensestrang. Diese Proben wurden für die Durchflusszytometrie verwendet um die Bindung des gesamten Konjugats zu untersuchen.

In weitere vier Eppendorfgefäße wurden ebenfalls je 150 µl Zellsuspension (ungefähr 180 000 Zellen) übergeführt. In eines wurden 100 pmol Konjugat (Duplex mit fluoreszenzmarkiertem AS-Strang) gegeben, in ein zweites 100 pmol siRNA (Duplex mit fluoreszenzmarkiertem AS-Strang), in ein drittes 100 pmol Alexa Fluor® 568-Antisensestrang. Dann wurde eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Danach wurde zwei Mal mit je 1 ml 1 x PBS (mit 1 % FCS), wie in Punkt 3.5.2.3 beschrieben, gewaschen. Die Zellen wurden in je 500 µl eiskaltem 1 x PBS (mit 1 % FCS) resuspendiert, in FACS-Röhrchen übergeführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Zuletzt erfolgte die Messung der 8 Proben mittels FACS-Gerät.

4 Resultate

4.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate

Der erste Schritt der Konjugatherstellung war die Bindung des Sulfo-SMCC-Linkers an das 3'-Amino-Oligonukleotid.

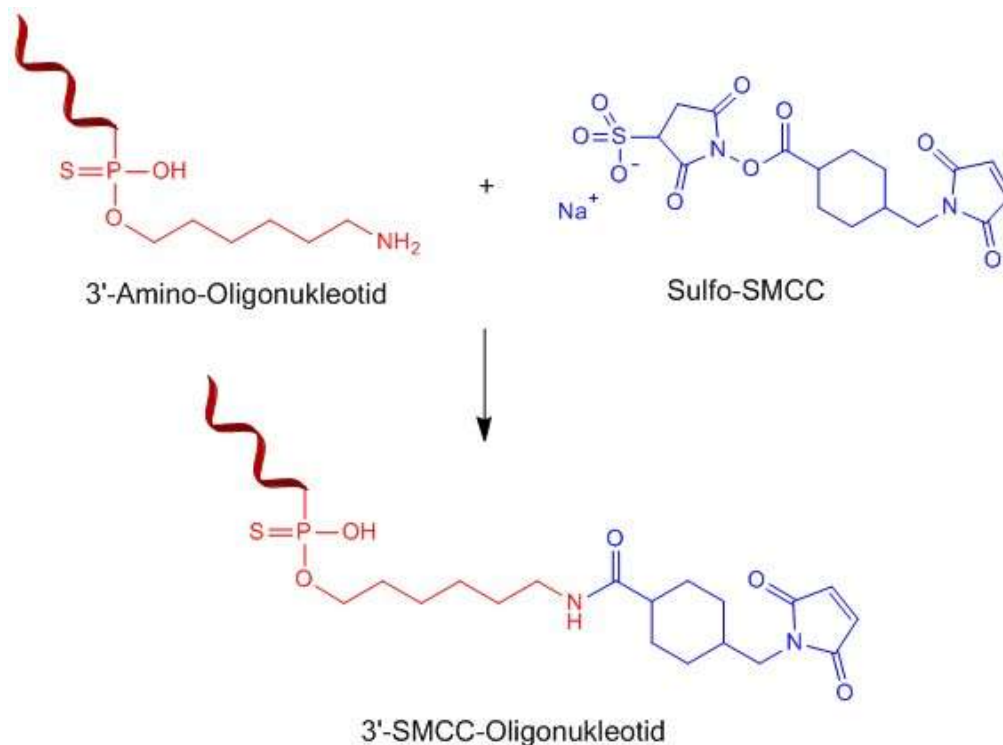


Abbildung 4.01: Reaktion zwischen 3'-Amino-Oligonukleotid und Sulfo-SMCC-Linker. Das Oligonukleotid besitzt am 3'-Ende eine Aminohexyl-Gruppe, die für die Ausbildung der Amidbindung mit dem N-Hydroxysuccinimidester des Linkers essentiell ist.

Ein zehnfacher Überschuss an Sulfo-SMCC und 100 mM PBS-Puffer pH 7,7, sodass eine Endkonzentration von 50 mM PBS erreicht wurde, wurden verwendet. Die Ausbeute betrug nach 5 Stunden Reaktionszeit 72 % (57,6 nmol der eingesetzten 80 nmol). Mit zwanzigfachem Überschuss lag der Anteil des SMCC-Oligonukleotids nach 3 Stunden bei 81 %, mit fünfzigfachem bei 85 %. Bei einem Versuch mit zwanzigfachem Überschuss an Linker und 100 mM PBS pH 7,1-7,4 (Endkonzentration 25 mM) wurde nach 5 Stunden eine Ausbeute von 23 % erreicht.

Dann erfolgte die Gelfiltration über Sephadex G25 und die Aufkonzentrierung der Oligonukleotid enthaltenden Fraktionen. Der Anteil der Nebenprodukte nahm nach diesem Schritt deutlich zu. 28 % (22,4 nmol) des eingesetzten Oligonukleotids waren nach diesem Schritt SMCC-modifiziert. Bei dem Versuch mit fünfzigfachem Linker-Überschuss war kein SMCC-modifiziertes Oligonukleotid nachweisbar. Es waren nur Nebenprodukte im Chromatogramm zu sehen.

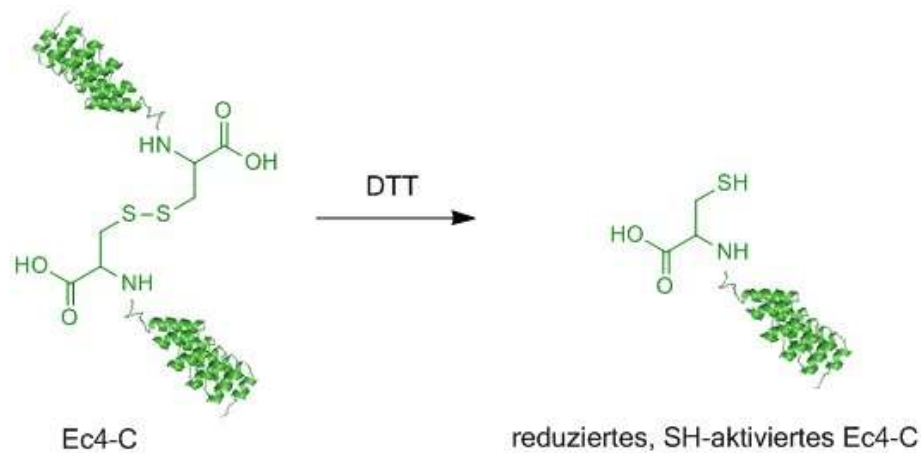


Abbildung 4.02: Reduktion des DARPins Ec4-C. Das Protein liegt als Dimer vor, und muss vor der Reaktion mit dem Linker reduziert werden um eine aktivierte Sulfhydryl-Gruppe zu erhalten. Diese ist für die Ausbildung der stabilen Thioether-Bindung notwendig.

Die Proteinreduktion erfolgte mittels DTT-Lösung. Dadurch wurde aus Dimer SH-aktiviertes Ec4-C für die Konjugationsreaktion gewonnen. Nach Gelfiltration über Sephadex G50 und Aufkonzentrierung der Protein enthaltenden Fraktionen wurden von 100 nmol Dimer ungefähr 50-60 nmol reduziertes DARPIn gewonnen. Somit betrug die Ausbeute 50-60 %.

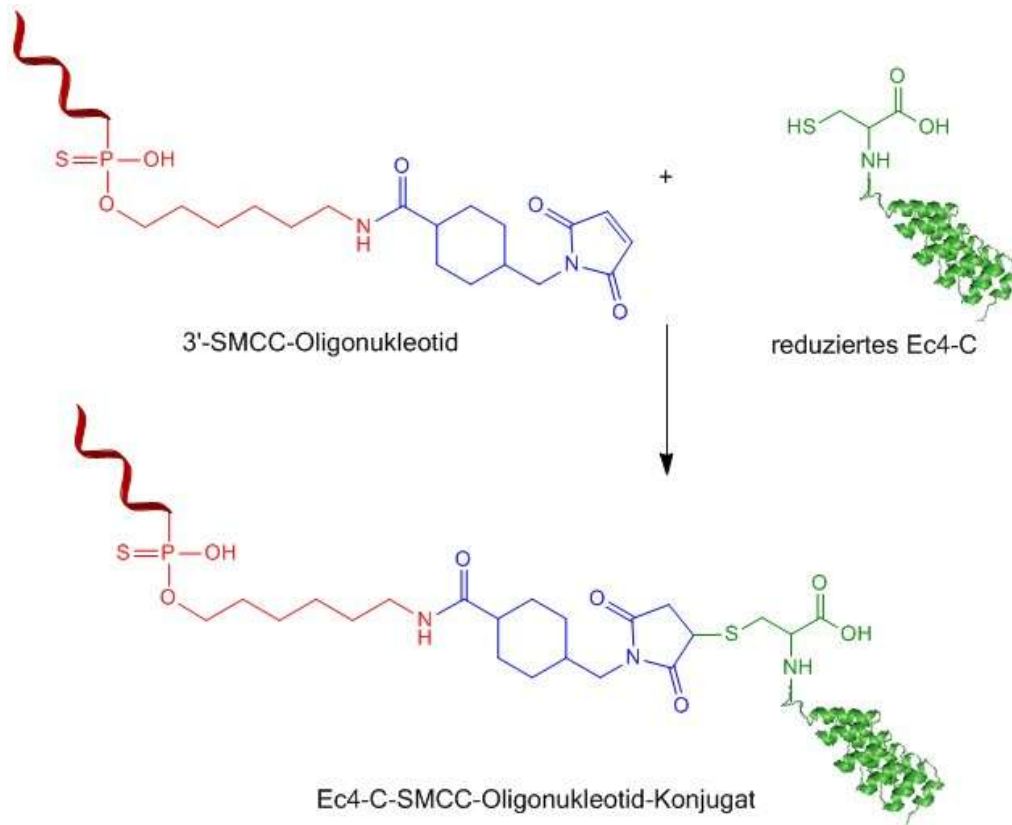


Abbildung 4.03: Reaktion zwischen SMCC-Oligonukleotid und reduziertem Ec4-C. Das Maleimid-aktivierte Oligonukleotid reagiert mit der aktivierten Sulfhydryl-Gruppe des DARPin, wodurch eine stabile kovalente Bindung entsteht.

Die Reaktion zwischen SMCC-Oligonukleotid und Ec4-C wurde in einem Verhältnis von 1,1:1 angesetzt. Gepuffert wurde mit 100 mM PBS-Puffer pH 7,1-7,4, sodass eine Endkonzentration von 50 mM erreicht wurde. Dieser Reaktionsschritt dauerte länger als der erste und wurde ungefähr nach 26 Stunden beendet. Die Ausbeute betrug ungefähr 38 % bezogen auf eingesetztes Protein. Bei einem Versuch mit denaturierendem Guanidin-HCl-Puffer (6 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris in bidest. Wasser) mit einer Endkonzentration von 4 M wurde ein pH von 8,3-8,5 erreicht. Dabei kam es zu keiner Konjugationsreaktion.

Durch die Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose wurde nach der Konjugation überschüssiges Oligonukleotid entfernt. Produkt enthaltende Fraktionen wurden vereinigt. Aufgrund des Elutionsmittels 250 mM Imidazol lag der pH-Wert bei 9-10. Daher wurde mit Amicon Zentrifugalfilter und 36,3 mM PBS-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM umgepuffert. Der gemessene pH-Wert war 7,4-7,7. Von den eingesetzten 18,18 nmol Protein wurden nach diesem Schritt 4,1 nmol (23 %) erhalten.

4.1.1 HPLC

Die Reaktionsverläufe bei der Herstellung der Konjugate wurden mittels HPLC überwacht.

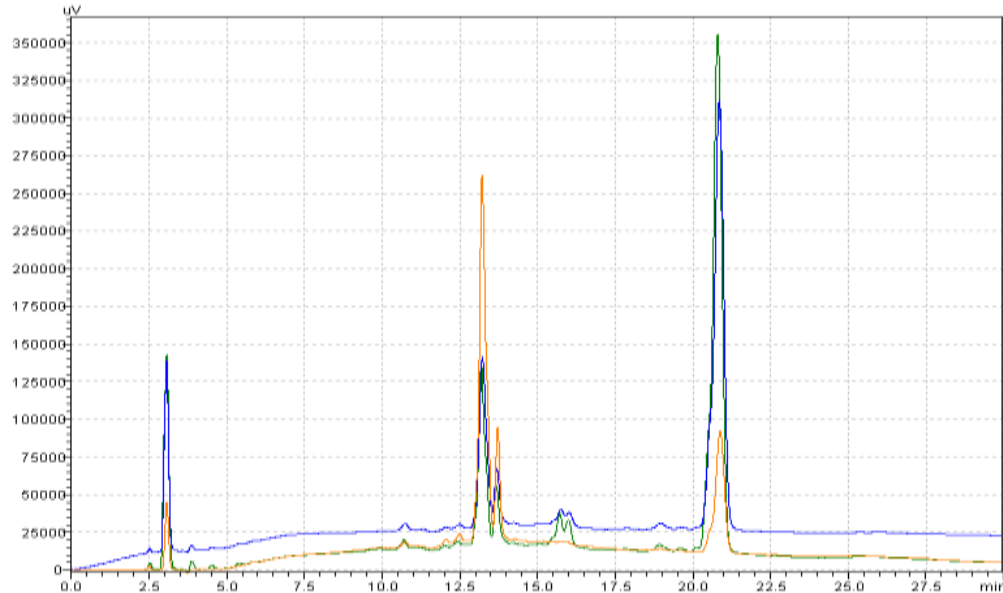


Abbildung 4.05: Chromatogramm des Reaktionsverlaufes von 3'-Amino-Oligonucleotid mit Sulfo-SMCC-Linker. Dieses Chromatogramm (Methode A, siehe Punkt 3.4.1) zeigt den Reaktionsverlauf zwischen 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Sensestrang und Sulfo-SMCC nach 10 Minuten, 2,5 Stunden und 5 Stunden. Das 3'-Amino-Oligonucleotid hat eine Retentionszeit von 13,2 Minuten, das 3'-SMCC-Oligonucleotid von 20,8 Minuten. Der Peak bei 15,7 Minuten stellt ein Nebenprodukt dar.

In Abbildung 4.05 kann man gut erkennen, dass die Bildung von 3'-SMCC-Oligonucleotid zeitabhängig ist, sich aber nach ein paar Stunden Reaktionszeit nur noch geringfügig steigert. Auch die Bildung von Nebenprodukten nimmt mit längerer Reaktionszeit zu. Daher wurde dieser Reaktionsschritt immer nach ungefähr 4-6 Stunden beendet. Nach 5 Stunden waren ungefähr 72 % des Oligonucleotids SMCC-modifiziert.

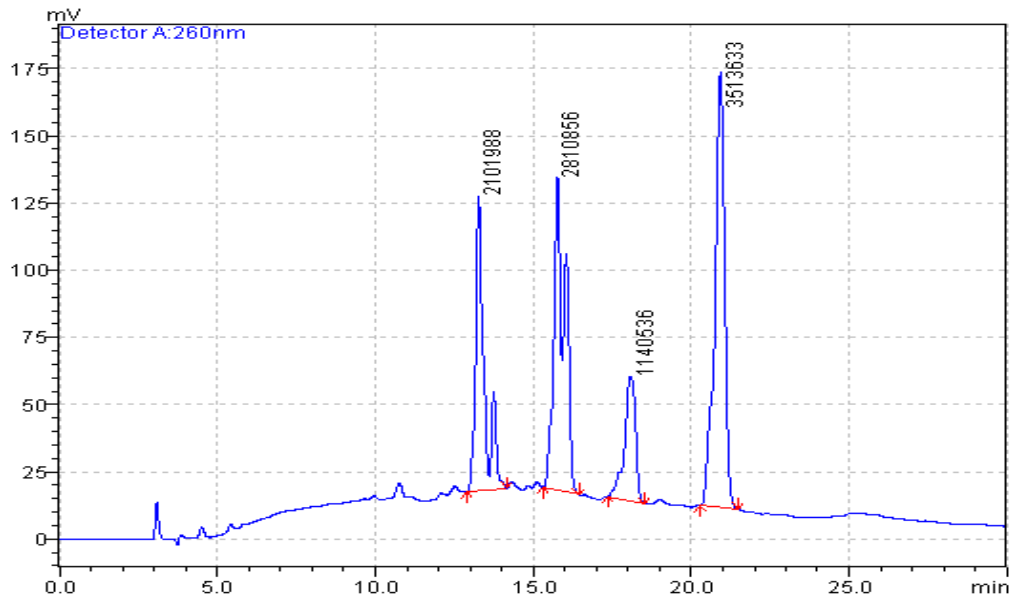


Abbildung 4.06: Chromatogramm des SMCC-Oligonukleotids nach Aufreinigung über Sephadex. Nach der Aufreinigung mit Sephadex G25 (Chromatogramm mit Methode A, siehe Punkt 3.4.1) kann man erkennen, dass mehr Nebenprodukt bei der Retentionszeit von 15,7 Minuten vorhanden ist. Außerdem hat sich ein weiteres Nebenprodukt gebildet, welches eine Retentionszeit von 18,1 Minuten aufweist.

Nach der Gelfiltration mit Sephadex G25 mit anschließender Aufkonzentrierung der produkthaltigen Fraktionen ergaben 28 % des eingesetzten Oligonukleotids das gewünschte Produkt. Der Grund der Bildung der Nebenprodukte war unklar. Vermutlich kommt es während der Aufreinigung und Aufkonzentration zu einer Nebenreaktion des Maleimids mit freien Aminogruppen der Oligonukleotide.

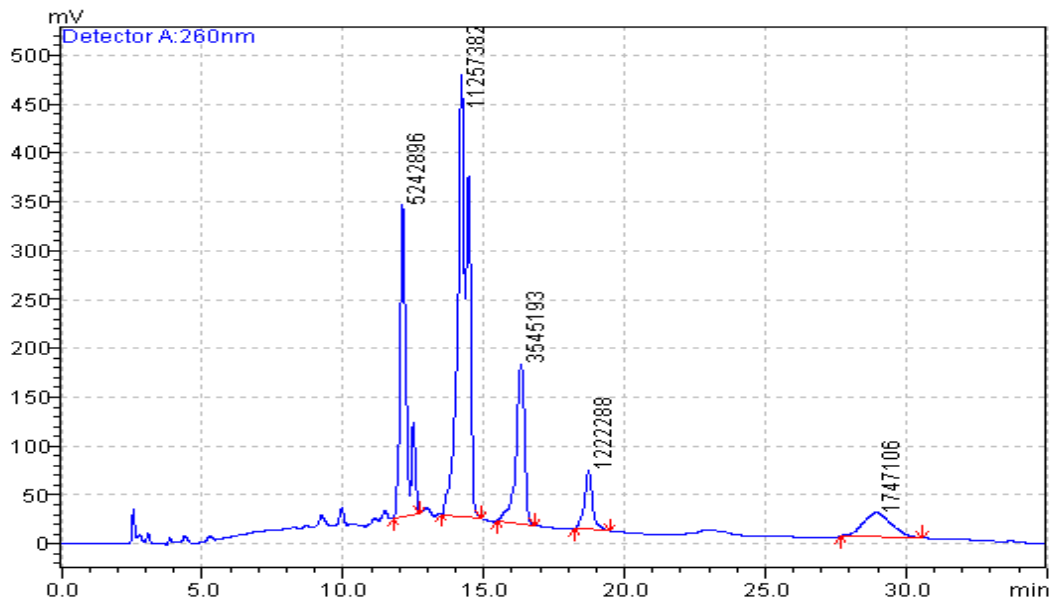


Abbildung 4.07: Chromatogramm der Konjugationsreaktion von Ec4-C mit SMCC-Oligonukleotid. Dieses Chromatogramm (Methode B, siehe Punkt 3.4.1) zeigt die Reaktion zwischen reduziertem Ec4-C und 3'-SMCC-Oligonukleotid nach 24 Stunden Reaktionszeit. Bei dieser Methode hat das 3'-Amino-Oligonukleotid eine Retentionszeit von 14,2 Minuten. Die beiden Peaks bei Minute 16,3 und 18,7 sind die Nebenprodukte, die bei der SMCC-Oligonukleotid-Herstellung und der Gelfiltration entstanden sind. Das 3'-SMCC-Oligonukleotid wird bei einer Retentionszeit von 18,7 Minuten, das Konjugat bei 29 Minuten eluiert.

Um überschüssige Oligonukleotide abzutrennen erfolgte die Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. Unreagiertes Protein wurde durch oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie entfernt.

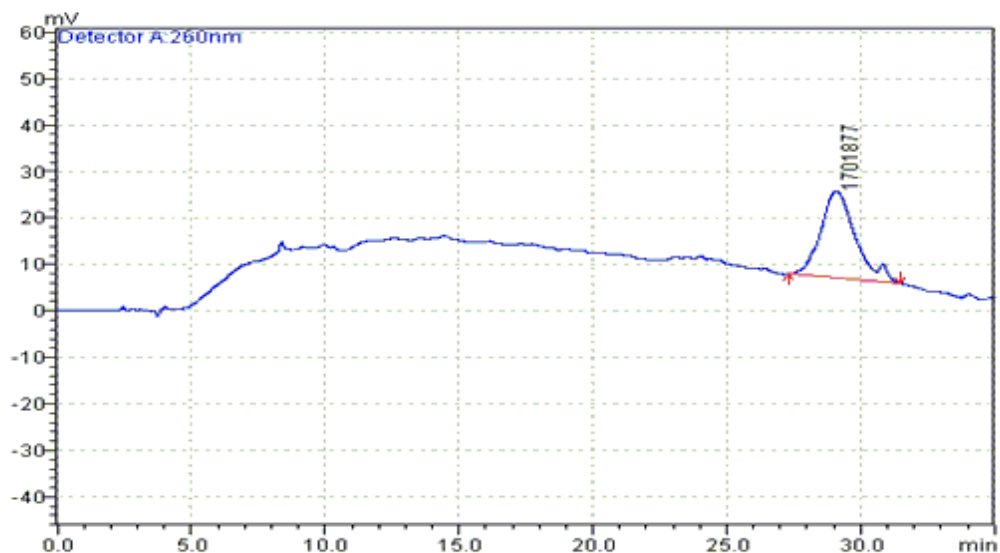


Abbildung 4.08: Chromatogramm des Konjugats nach oligonukleotidbasierter Affinitätschromatographie. Nach der Aufreinigung des Konjugats über der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie ist nur noch ein Peak bei 29 Minuten im Chromatogramm (Methode B, siehe Punkt 3.4.1) sichtbar.

Die HPLC nach der Affinitätschromatographie zeigt, dass die Aufreinigung des Konjugats gut funktioniert und ein reines Produkt ergeben hat. Die Ausbeute an aufgereinigtem Konjugat bezogen auf eingesetztes Protein betrug ungefähr 16 %.

4.1.2 SDS-Polyacrylamidgel (12%)

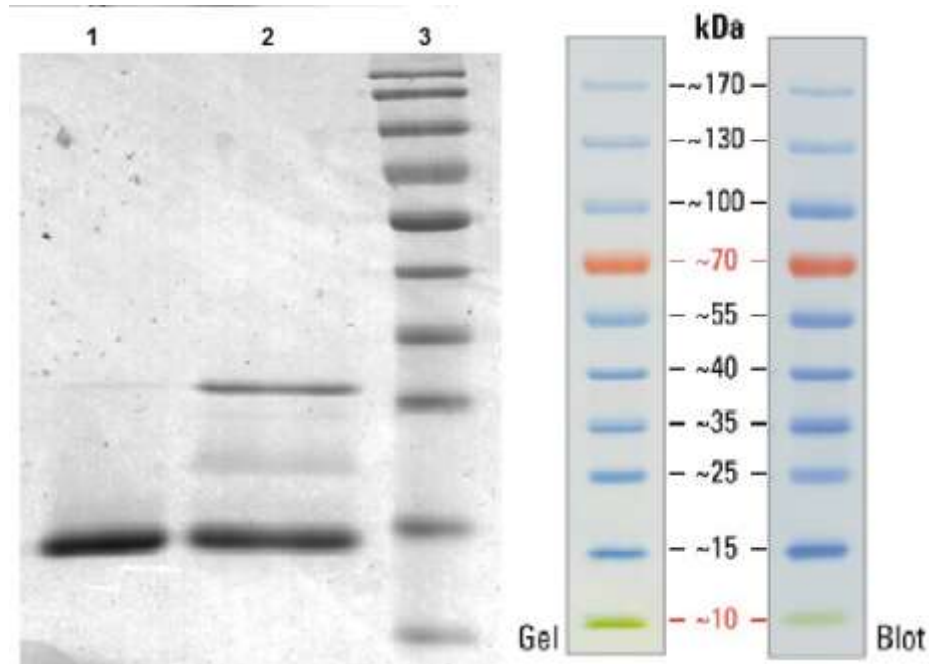


Abbildung 4.09: SDS-Polyacrylamidgel (12%) und der verwendete Standard PageRuler Prestained Protein Ladder. **1**: reduziertes Ec4-C, **2**: Konjugation Ec4-C und 3'-SMCC-Anti-Luciferase Negativkontrolle siRNA Sensestrang, nach 23 Stunden Reaktionszeit, **3**: Standard PageRuler Prestained Protein Ladder. Bei 1 und 2 sieht man je eine Bande bei ~15 kDa. Dabei handelt es sich um reduziertes Ec4-C. Die Bande bei ~30 kDa zeigt dimerisiertes Protein. Diese Bande ist bei 2 stärker ausgeprägt als bei 1. Bei 2 ist noch eine dritte Bande bei ungefähr 20 kDa zu sehen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Konjugat.

Da die Intensität der Banden des reduzierten Ec4-Cs bei 1 und 2 (siehe Abbildung 4.09) nahezu gleich ist, kann man keine quantitativen Aussagen zur Reaktion treffen. Man kann zwar durch die dritte Bande bei 2 erkennen, dass eine Reaktion stattgefunden hat, aber nicht in welchem Ausmaß. Daher ist für genauere Aussagen die HPLC-Analyse besser geeignet.

4.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie

Nach der Synthese, Entschützung und Aufreinigung der Biotin-DNA (siehe Punkt 3.2) wurde eine HPLC-Analyse (Methode B, siehe Punkt 3.4.1) durchgeführt um herauszufinden, wie erfolgreich die Herstellung eines geeigneten 7mers für die oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie war.

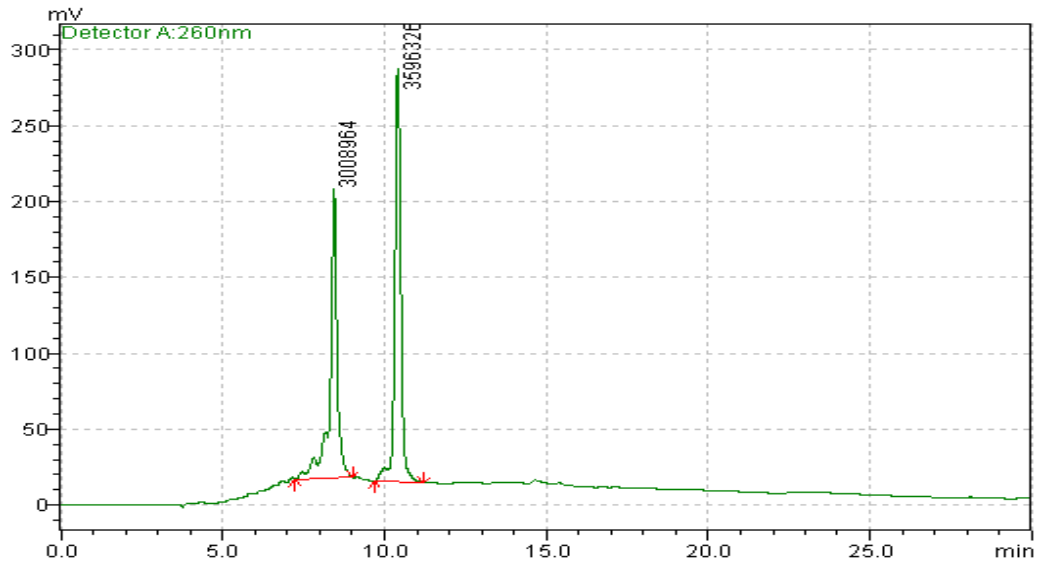


Abbildung 4.10: Chromatogramm des synthetisierten Biotin-Oligonukleotids. Im Chromatogramm des synthetisierten Biotin-Oligonukleotids mit einer 7mer-Bindungssequenz sind zwei Peaks zu sehen. Der erste hat eine Retentionszeit von 8,4 Minuten, der zweite von 10,3 Minuten. Bei dem ersten handelt es sich um nicht biotinylierte DNA mit geringen Mengen an Fehlsequenzen. Der zweite stellt das gewünschte 7mer dar.

Nach Bindung des 7mers an Streptavidin-Sepharose (siehe Punkt 3.2.3) wurde eine weitere HPLC-Analyse des Filtrats durchgeführt um zu sehen, wie gut die Bindung funktioniert hatte.

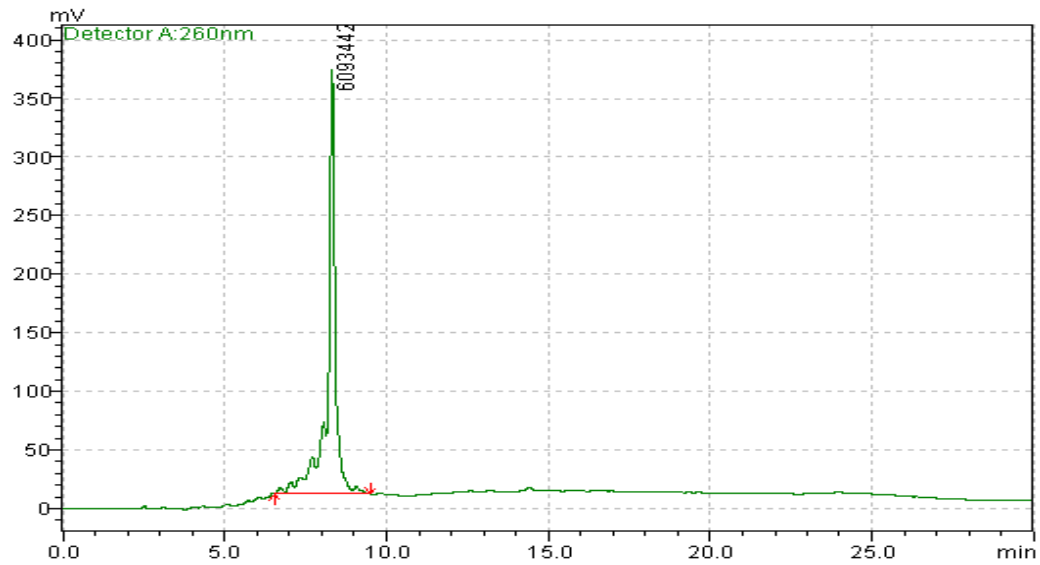


Abbildung 4.11: Chromatogramm des Filtrats nach Bindung des Biotin-Oligonukleotids an Streptavidin-Sepharose. Es ist nur noch der erste Peak sichtbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Biotin-7mer vollständig an Streptavidin-Sepharose gebunden hat.

Um eine vollständige Bindung zu erreichen musste mit einem Überschuss an Streptavidin-Sepharose gearbeitet werden.

4.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568

Nach der Synthese des aminohexyl-modifizierten Oligonukleotids wurde mittels Harnstoff-Polyacrylamidgel (20 %) eine Gelelektrophorese durchgeführt.

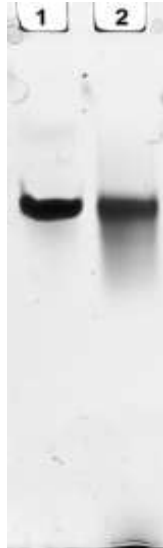


Abbildung 4.12: Harnstoff-Polyacrylamidgel (20%) des synthetisierten 3'-Amino-Oligonukleotids. Das synthetisierte Oligonukleotid 3'-Amino-Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang (2) wurde mit Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang von GSK (1) verglichen. Die Bande des selbst hergestellten Oligonukleotids zeigt ein leichtes Tailing, das auf vorhandene Fehlsequenzen hinweist.

Wie die Gelelektrophorese zeigte, waren Fehlsequenzen vorhanden, die nicht entfernt werden konnten. Daher wurde mit der Mischung gearbeitet und auf den gewünschten 3'-Amino-Antisensestrang rückgerechnet.

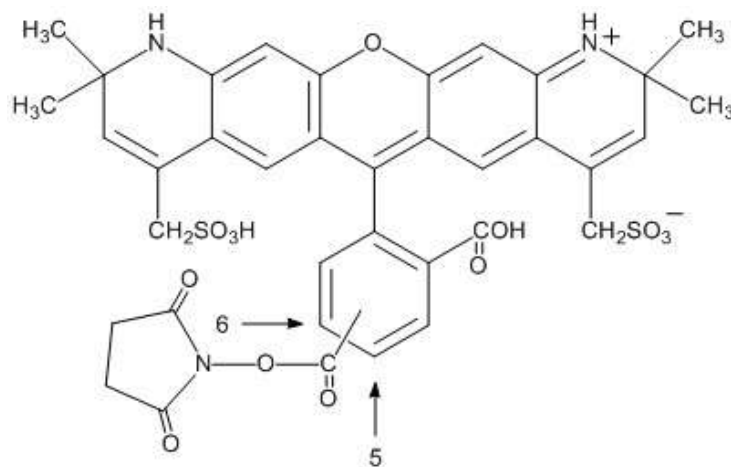


Abbildung 4.13: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor® 568. Seine maximale Fluoreszenzanregung liegt bei 578 nm, das Emissionsmaximum bei 603 nm.

7,3 nmol des 3'-Amino-Oligonukleotids wurden für die Markierung mit Alexa Fluor® 568 eingesetzt. Um nach erfolgter Reaktion unreakierten Farbstoff zu entfernen folgte die Fällung des fluoreszenzmarkierten Antisensestrangs mit Ethanol.

Die Fluoreszenzmarkierung mit Alexa Fluor® 568 ergab laut Nano-Drop-Spektrophotometer-Messung ungefähr 6,5 nmol markierten Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang. 89 % des eingesetzten Oligonukleotids reagierten zum gewünschten Produkt.

4.4 Natives Polyacrylamidgel (10%) zum Nachweis der Duplexbildung

Der Nachweis der Duplexbildung erfolgte mittels nativem Polyacrylamidgel (10 %). Dazu wurden je 100 pmol der aufzutragenden Proben verwendet.

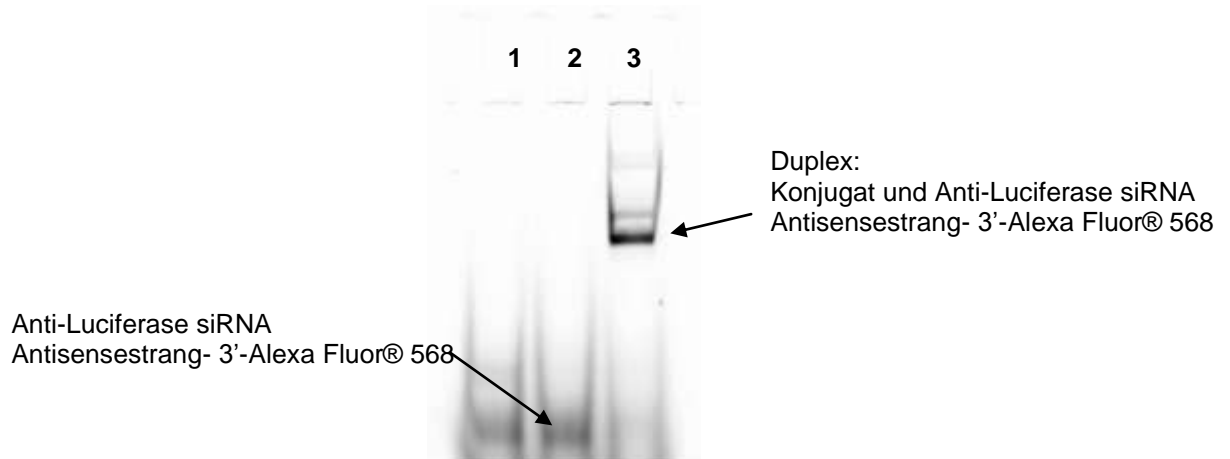


Abbildung 4.14: Natives Polyacrylamidgel zum Nachweis der Duplexbildung. Diese Abbildung zeigt das 10 % Polyacrylamidgel mit 3 Proben. **1:** Duplex Anti-Luciferase siRNA Sensestrang und Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang-3'-Alexa Fluor® 568, **2:** Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang-3'-Alexa Fluor® 568, **3:** Duplex Konjugat und Anti-Luciferase siRNA Antisensestrang-3'-Alexa Fluor® 568.

Die Bande bei 2 ist vermutlich der fluoreszenzmarkierte Antisensestrang. Die obere Bande bei 3 stellt der Duplex zwischen Konjugat und fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang dar. Es ist ein deutlicher Shift zwischen fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid allein und Duplex zu sehen, daher kann von einer erfolgreichen Duplexbildung mit dem konjugierten Sense-Strang ausgegangen werden.

4.5 Zellkulturtests

4.5.1 Luciferase-Test

Mit diesem Zellkulturtest sollte festgestellt werden, ob mit Konjugat eine Herunterregulierung des Luciferase-Gens erreicht werden kann. Durch den Bradford-Test wurden die Lumineszenz-Werte durch Berechnung der Proteinmengen auf die vorhandenen Zellzahlen (Lumineszenz/Proteinmenge) korrigiert. Dadurch sollten zu hohe Schwankungen der Werte durch unterschiedliche Zellzahlen in den Wells vermieden werden.

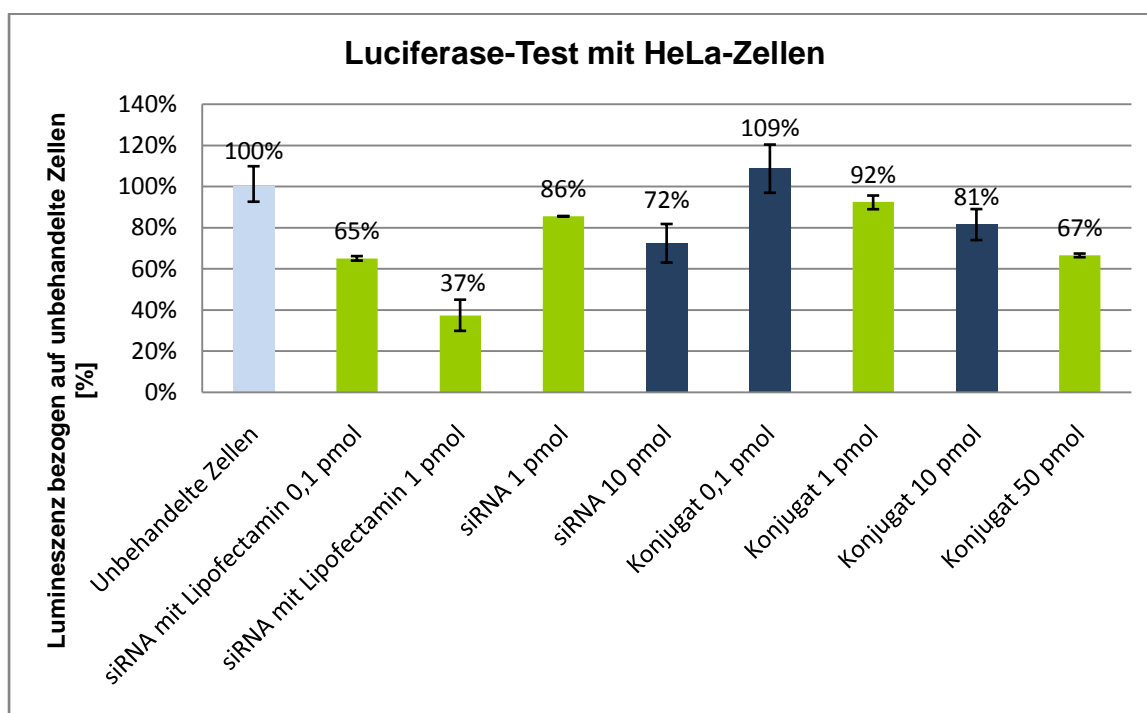


Diagramm 4.01: Ergebnisse des Luciferase-Tests mit HeLa-Zellen. Die Herunterregulierung des Luciferase-Gens bei den HeLa-Zellen wird hier graphisch dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wird mittels Student-t-Test bestimmt. Die signifikanten Werte sind grün hervorgehoben.

Der größte Effekt wurde durch die siRNA mit Lipofectamin erreicht. Konjugat und siRNA ohne Lipofectamin hatten geringere Auswirkungen. Der Effekt war konzentrationsabhängig. Zellen, die mit einer höheren Menge an Transfektionsreagens behandelt worden waren, wiesen deutlich geringere Lumineszenzwerte auf.

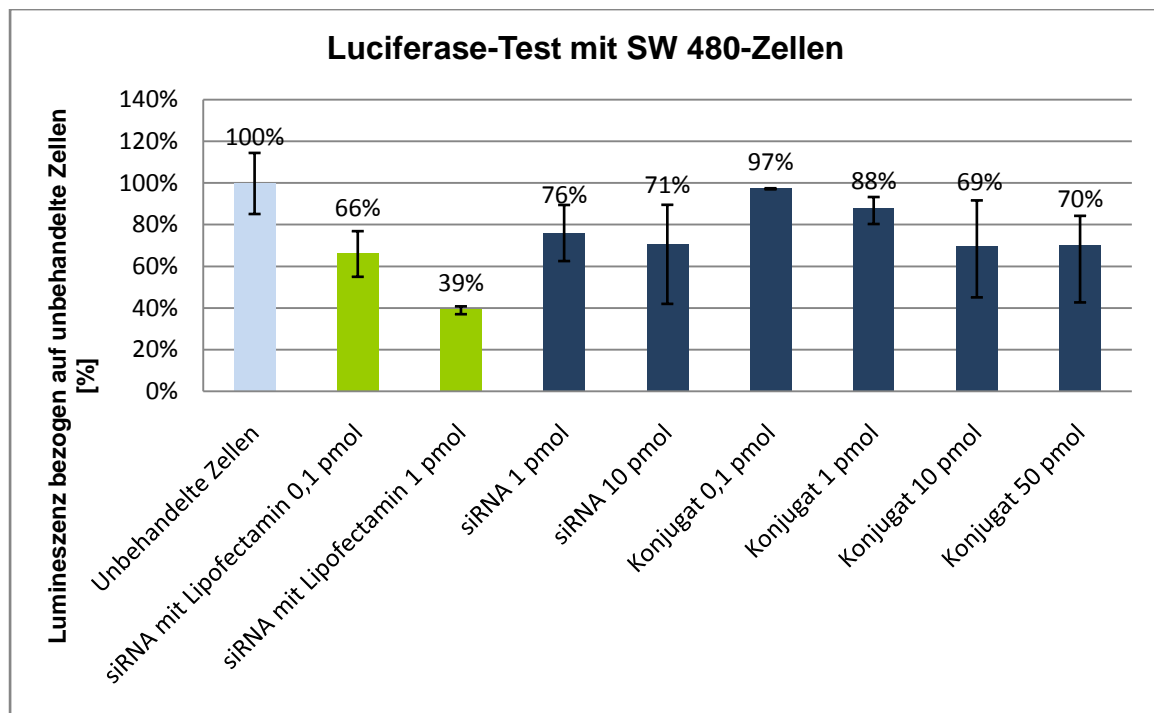


Diagramm 4.02: Ergebnisse des Luciferase-Tests mit SW 480-Zellen. Die Graphik zeigt die Herunterregulierung des Luciferase-Gens bei den SW 480-Zellen. Auch hier sind die signifikanten Werte ($p < 0,05$) laut Student-t-Test grün markiert.

Auch bei den SW 480-Zellen wurde der größte Effekt durch siRNA mit Lipofectamin erreicht. Außerdem fiel auch hier die Konzentrationsabhängigkeit auf. Mit siRNA ohne Lipofectamin oder Konjugat wurde keine signifikante Herunterregulierung erzielt.

4.5.2 Durchflusszytometrie

Dieser Zellkulturtest wurde durchgeführt um die Bindung des Konjugats an MDA-MB 468 Zellen zu untersuchen. Dies war durch den fluoreszenzmarkierten Antisensestrang möglich. Die Bindung des DARPin selbst wurde durch den fluoreszierenden Antikörper Penta His Tag gezeigt.

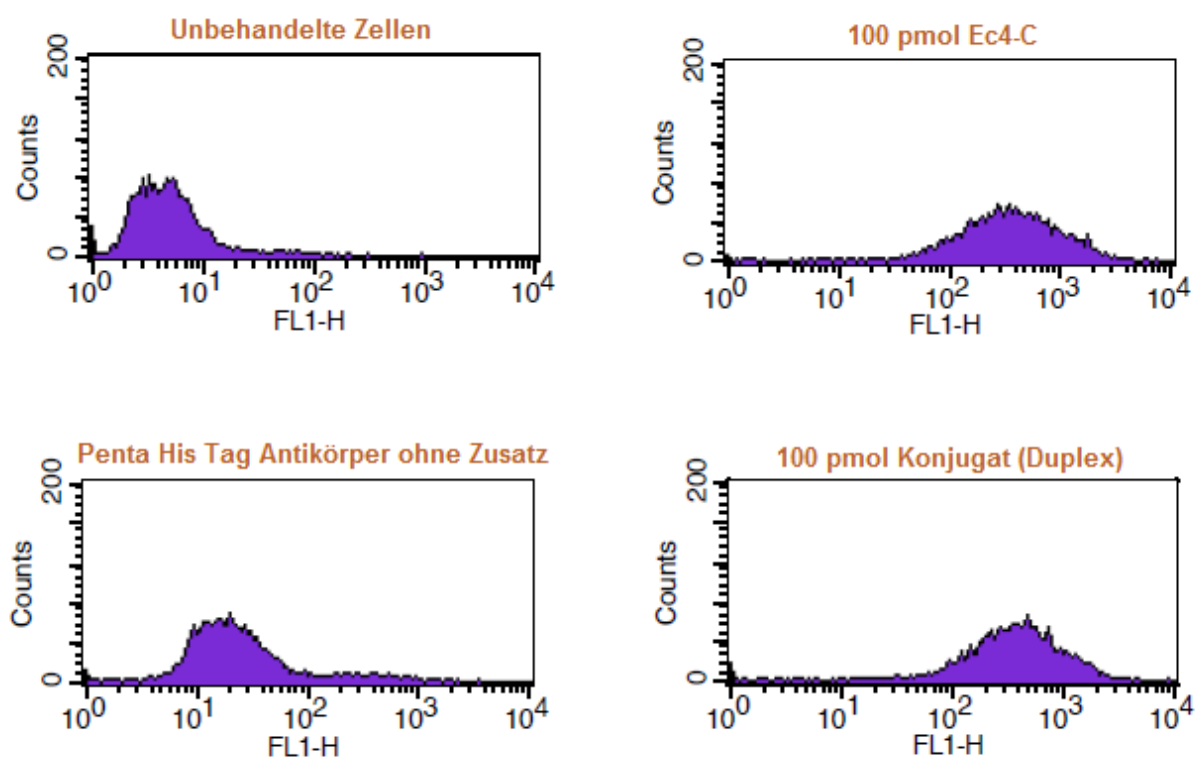


Abbildung 4.15: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Proben mit Penta His Tag Antikörper an MDA-MB-486 Brustkrebszellen. Bei dem Penta His Tag Antikörper ist eine leichte Verschiebung durch unspezifische Bindung zu sehen, wobei bei den Proben mit Ec4-C und Konjugat eine deutliche Veränderung, die eine erfolgreiche Assoziation beweist, erkennbar ist.

Die Verschiebung, die bei den Proben mit Ec4-C und Konjugat gut zu sehen ist (siehe Abbildung 4.15), beweist die erfolgreiche Assoziation mit den Zellen. Da der Antikörper an das DARPin bindet, kann die Bindung des vollständigen Konjugats nicht gezeigt werden. Dazu dienten die Proben mit fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang.

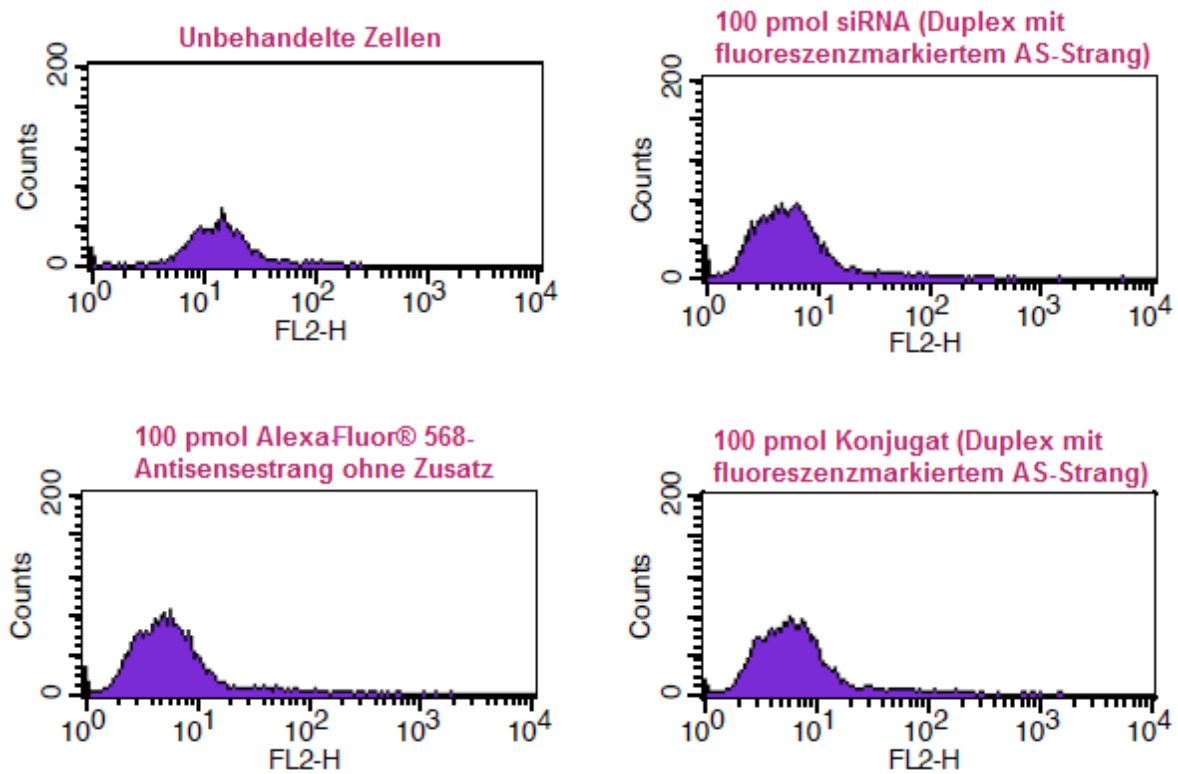


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Proben mit Alexa Fluor® 568-Antisensestrang an MDA-MB-486 Brustkrebszellen. Es ist keine Verschiebung bei den Proben erkennbar. Daher konnte keine Assoziation des fluoreszenzmarkierten Gegenstranges gezeigt werden.

Durch den FACS-Versuch mit den Proben mit fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang konnte keine Assoziation des fluoreszenzmarkierten Gegenstranges nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Herstellung und Aufreinigung der Konjugate

Bei der Herstellung des 3'-SMCC-Oligonukleotids war der pH-Wert von 7,7 entscheidend. Bei niedrigerem pH wurde eine geringere Ausbeute erhalten. Statt ungefähr 72 % reagierten bei einem pH von 7,1-7,4 nur rund 23 % des eingesetzten Oligonukleotids zum gewünschten Produkt. Auch mit erhöhtem Überschuss an Sulfo-SMCC (zwanzig- oder fünfzigfach) wurde die Ausbeute erhöht (über 80 %), allerdings nahm der Anteil der Nebenprodukte mit längerer Reaktionszeit und nach der Aufreinigung über Sephadex G25 zu. Die Ursache der Bildung dieser Nebenprodukte und deren Charakterisierung muss noch untersucht werden. Wahrscheinlich kommt es durch eine längere Reaktionszeit und bei der Aufkonzentration nach der Entsalzung zu einer Reaktion des Maleimids mit Aminen der Oligonukleotide. Obwohl die Reaktivität von Maleimiden gegen Thiole bei einem pH Wert von 7 ca. 1000fach höher ist als gegen Amine, kann es bei längerer Reaktionsdauer und vor allem bei pH Werten über 8 zu einem Verlust der Thiol- Spezifität und einer Addition von primären Aminen an die Doppelbindung des Maleimids kommen³³. Vermutlich kommt es also bei der Aufarbeitung der Reaktionsmischung durch diese Reaktion zu einer Dimerisierung.

Die Konjugation des DARPin mit 3'-SMCC-Oligonukleotid erfolgte, aufgrund der oben beschriebenen Problematik der spezifischen Reaktivität der aktivierten Maleimid-Gruppe bei höheren pH-Werten, bei einem pH von 7,1-7,4. Bei einem Versuch mit Guanidin-HCl-Puffer pH 8,3-8,5 war gar keine Reaktion nachweisbar. Dieser Reaktionsschritt war, wie der erste, zeitabhängig. Nach ungefähr 25-26 Stunden nahm die Ausbeute aber nur minimal zu. Daher wurde die Reaktion meist nach 26 Stunden beendet.

Durch die Aufreinigung der Konjugate über Ni-NTA-Agarose konnte der Oligonukleotid-Überschuss, über die oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie unreaktiertes Protein entfernt werden. Dadurch wurde reines Produkt erhalten.

Zur Überwachung der einzelnen Reaktionsverläufe und Aufreinigungsschritte erwies sich die HPLC als besonders geeignet. Dazu wurden zwei Methoden verwendet (siehe Punkt 3.4.1). Dadurch war die Quantifizierung der Produkte, Nebenprodukte und Ausgangsstoffe möglich.

Die Reaktion zwischen DARPin und Oligonukleotid konnte ebenfalls durch ein SDS-Polyacrylamidgel (12%) überprüft werden. Es waren aber keine quantitativen Aussagen möglich. Daher eignete sich die Analyse durch HPLC besser.

5.2 Entwicklung und Vorbereitung der oligonukleotidbasierten Affinitätschromatographie

Mit Hilfe eines vollautomatischen Synthesizers wurde die Biotin-DNA hergestellt. Ein 7mer des komplementären Strangs wurde mit einem Linker synthetisiert. Dadurch sollte die Hinderung der Duplexbildung durch eine ungünstige stereochemische Lage vermieden werden. Auch die Biotinylierung am 5'-Ende erfolgte durch den Synthesizer. Mit Hilfe einer HPLC wurde der Anteil des gewünschten Produktes bestimmt.

Obwohl die Reaktion des Biotin-Bausteins nur rund 50 % Ausbeute erreichte, konnte die Komplexierung an immobilisierte Sepharose erfolgreich durchgeführt werden. Um eine vollständige Bindung zu erreichen wurde mit einem Überschuss an Streptavidin-Sepharose gearbeitet. Fehlsequenzen und nicht entschützte DNA konnten danach leicht durch Waschen des Säulchens entfernt werden.

Da die Duplexbildung mit dem komplementären Strang bei einer höheren Salzkonzentration erfolgt, wurde mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM gearbeitet und gewaschen. Durch abnehmende Salzkonzentration wurde der Duplex wieder dissoziiert und das Konjugat konnte eluiert werden.

Diese Methode bietet die Möglichkeit Konjugate oder siRNA spezifisch zu binden und so reine Produkte zu erhalten.

5.3 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Amino-Antisensestrangs mit Alexa Fluor® 568

Der fluoreszenzmarkierte Antisensestrang sollte weitere Untersuchungen des Konjugats, wie die der Duplexbildung und der EpCAM-spezifischen Bindung an Zellen, ermöglichen.

Die Synthese des 3'-Amino-Antisensestrangs erfolgte mittels vollautomatischen Synthesizer mit Amino-On-CPG-Harz. Durch das spezielle Harz wurde am 3'-Ende ein Aminohexyl-Rest erhalten, wodurch weitere Modifikationen der RNA möglich sind³². In diesem Fall war dadurch die Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 568 möglich. Durch die Synthese wurden neben der gewünschten RNA auch Fehlsequenzen erhalten, die nicht entfernt werden konnten. Daher wurde mit der Mischung gearbeitet.

Nach Entschützung, Aufreinigung, Dialyse und Analyse der synthetisierten RNA mittels Gelelektrophorese erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Alexa Fluor® 568. Um überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen, wurde das Oligonukleotid mit Ethanol gefällt. Laut Nano-Drop-Spektrophotometer-Messungen bei 578 nm und 260 nm waren zwar 89 % des eingesetzten Oligonukleotids fluoreszenzmarkiert. Allerdings war beim nativen Polyacrylamidgel (10 %) eine starke Bande nahe der Front, mit hoher Wahrscheinlichkeit freier Fluoreszenzfarbstoff, zu erkennen. Auch durch den FACS-Versuch wurde die Vermutung bestärkt, dass die Fluoreszenzmarkierung und die anschließende Abtrennung nicht reagierten Farbstoffes nicht zufriedenstellend funktioniert hatte.

5.4 Natives Polyacrylamidgel (10 %) zum Nachweis der Duplexbildung

Durch die Gelelektrophorese mit einem nativen Polyacrylamidgel (10 %) nach der Duplexbildung des Konjugats mit dem fluoreszenzmarkierten Antisensestrang sollte nachgewiesen werden, dass das Konjugat zur Duplexbildung befähigt ist. Auf dem Gel war ein eindeutiger Shift zwischen fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid allein und dem Duplex mit Konjugat zu sehen. Daher kann von einer erfolgreichen Duplexbildung ausgegangen werden.

Interessant ist auch, dass sehr viel freier Farbstoff auf dem Gel sichtbar war. Das könnte auf unzureichende Fluoreszenzmarkierung und einen dadurch hohen Farbstoffüberschuss zurückzuführen sein.

5.5 Zellkulturtests

5.5.1 Luciferase-Test

Mit dem Luciferase-Test sollte festgestellt werden, ob das Konjugat eine Herunterregulierung des Luciferase-Gens bewirkt. Durch den Bradford-Test konnten die Lumineszenz-Werte durch Berechnung der Proteinmengen auf die vorhandenen Zellzahlen korrigiert werden. So wurden hohe Schwankungen der Werte aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen in den Wells vermieden.

Der Effekt verschiedener Konzentrationen des Konjugats wurde mit dem verschiedener Konzentrationen von siRNA mit und ohne Lipofectamin verglichen. Außerdem wurden zwei Zelllinien mit Luciferase-Plasmid verwendet. Die HeLa-Zellen exprimieren nur wenig EpCAM, wobei die SW 480-Zellen eine höhere EpCAM-Expression aufweisen. Da das Konjugat mit einem EpCAM-spezifischen DARPin ausgestattet war, sollte die Herunterregulierung des Zielgens in SW 480-Zellen deutlich effizienter sein. Allerdings gab es zwischen den zwei Zelllinien keine signifikanten Unterschiede des Gen-Silencings. Eindeutig war, dass die Positivkontrolle durch siRNA mit Lipofectamin eine signifikante Reduktion des gebildeten Luciferaseproteins bewirkte. SiRNA ohne Transfektionsreagenz und Konjugat führten aber nur zu einer geringen Hemmung der Luciferase-Expression. Außerdem war festzustellen, dass die Wirkung der Oligonukleotide immer konzentrationsabhängig war.

5.5.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Bindung des Konjugats an MDA-MB-468-Zellen untersucht. Die Zelllinie war EpCAM-positiv. Daher sollte das EpCAM-spezifische DARPin Ec4-C an sein Target binden. Die Bindung des Konjugats wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Antisensestrang untersucht. Mit dem fluoreszierenden Antikörper Penta His Tag, der an Ec4-C bindet, konnte die Bindung des DARPins selbst gezeigt werden.

Die Bindung von Ec4-C konnte durch diesen FACS-Versuch eindeutig festgestellt werden. Auch beim Konjugat mit Antikörper war eine Bindung im selben Ausmaß erkennbar.

Bei den Proben mit fluoreszenzmarkiertem Antisensestrang war allerdings kein erfolgreiches Ergebnis zu sehen. Dies kann auf fehlende Bindung, keine Duplexbildung oder unzureichende Fluoreszenzmarkierung des Antisensestrangs hinweisen. Um den Grund erläutern zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig. Allerdings deuten viele Ergebnisse, wie das des nativen Polyacrylamidgels (10 %), darauf hin, dass der Antisensestrang nicht ausreichend fluoreszenzmarkiert war.

5.6 Konklusion

Konjugate aus DARPins und Oligonukleotiden bieten neue Möglichkeiten des spezifischen Targetings therapeutischer Oligonukleotide. Mit Hilfe der DARPins kann so gut wie jedes beliebige Antigen gebunden werden. Dadurch könnten zum Beispiel spezifisch Krebszellen erreicht werden.

Die Herstellung der Konjugate ist nicht aufwendig und kann in kurzer Zeit erfolgen. Die Reaktionsausbeuten sind abhängig von pH, Reaktionszeit und dem Überschuss an Ausgangssubstanzen. Die höchsten Ausbeuten und der geringste Anteil an Nebenprodukten wurden bei der Reaktion zwischen 3'-Amino-Oligonukleotid und Linker mit einem PBS-Puffer pH 7,7 und einem zehnfachen Sulfo-SMCC-Überschuss erreicht. Die optimale Reaktionsdauer lag bei rund 5 Stunden. Die Reaktion des SMCC-Oligonukleotids mit dem DARPin wurde im Verhältnis 1,1:1 in PBS-Puffer pH 7,1-7,4 angesetzt und nach ungefähr 26 Stunden beendet. Durch die folgenden Aufreinigungsschritte mit Ni-NTA-Agarose und oligonukleotidbasierter Affinitätschromatographie wurde ein reines Produkt erhalten, mit welchem weitere Untersuchungen der Duplexbildung, des Gen-Silencings und der EpCAM-spezifischen Zellbindung durchgeführt wurden.

Die Duplexbildung konnte durch ein natives Polyacrylamidgel (10 %) mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Antisensestrangs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Bindung an EpCAM-exprimierende Zellen und Gen-Silencing durch Konjugate waren teilweise nicht eindeutig. Eine signifikante Herunterregulierung des Luciferase-Gens durch das Konjugat konnte in der durchgeführten vorläufigen Evaluierung nicht gezeigt werden. Gründlichere Untersuchungen sollen zeigen, ob eine Wirkung in anderen Konzentrationen oder nach längerer Behandlung eintritt bzw. ob eine labile Bindung zwischen siRNA und Trägerprotein nötig ist, um die endosomale Freisetzung zu ermöglichen.

Trotzdem ist der Ansatz der Applikation von siRNA-DARPin-Konjugaten therapeutisch sehr interessant. Möglicherweise können dadurch in der Zukunft einige limitierende Faktoren der siRNA-basierten Therapie aufgehoben oder zumindest verbessert werden.

6 Abkürzungen

AMA	methanolisches Methylamin/Ammoniumhydroxid; 1:1
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CPG	Controlled Pore Glass
DARPin	Designed Ankyrin Repeat Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dsRBP	dsRNA-binding domain; dsRNA-Bindungsdomäne
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum; fetales bovines Serum
HCl	Hydrochlorid
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie, die von der Patientin Henrietta Lacks stammt
HF	Hydrofluorid
HI-Viren	Humane Immundefizienz-Viren
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAR II	Luciferase Assay Reagents II
MDA-MB 468	Humane Brustadenokarzinom-Zelllinie
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetylsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline; salzhaltiger Phosphatpuffer
PLB	Passive Lysis Buffer; passiver Lysepuffer
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
SW 480	Humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

7 Referenzen

- 1 Hannon, Gregory J. "RNA interference." *Nature* 418, no. 6894 (2002): 244-251.
- 2 Zamore, Phillip D. "Ancient pathways programmed by small RNAs." *Science* 296, no. 5571 (2002): 1265-1269.
- 3 MacRae, Ian J., Kaihong Zhou, Fei Li, Adrian Repic, Angela N. Brooks, W. Zacheus Cande, Paul D. Adams, and Jennifer A. Doudna. "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer." *Science* 311, no. 5758 (2006): 195-198.
- 4 Gan, Jianhua, Joseph E. Tropea, Brian P. Austin, Donald L. Court, David S. Waugh, and Xinhua Ji. "Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III." *Cell* 124, no. 2 (2006): 355-366.
- 5 Sashital, Dipali G., and Jennifer A. Doudna. "Structural insights into RNA interference." *Current opinion in structural biology* 20, no. 1 (2010): 90-97.
- 6 Carthew, Richard W., and Erik J. Sontheimer. "Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136, no. 4 (2009): 642-655.
- 7 Wang, Jie, Ze Lu, M. Guillaume Wientjes, and Jessie L-S. Au. "Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers." *The AAPS journal* 12, no. 4 (2010): 492-503.
- 8 Aigner, Achim. "Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs." *Journal of biotechnology* 124, no. 1 (2006): 12-25.
- 9 Aagaard, Lars, and John J. Rossi. "RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges." *Advanced drug delivery reviews* 59, no. 2 (2007): 75-86.
- 10 Tiemann, Katrin, and John J. Rossi. "RNAi-based therapeutics—current status, challenges and prospects." *EMBO molecular medicine* 1, no. 3 (2009): 142-151.
- 11 Castanotto, Daniela, and John J. Rossi. "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." *Nature* 457, no. 7228 (2009): 426-433.
- 12 Leung, Ray KM, and Paul A. Whittaker. "RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics." *Pharmacology & therapeutics* 107, no. 2 (2005): 222-239.

- 13 Burnett, John C., and John J. Rossi. "RNA-based therapeutics: current progress and future prospects." *Chemistry & biology* 19, no. 1 (2012): 60-71.
- 14 Davidson, Beverly L., and Paul B. McCray. "Current prospects for RNA interference-based therapies." *Nature Reviews Genetics* 12, no. 5 (2011): 329-340.
- 15 Petrocca, Fabio, and Judy Lieberman. "Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer." *Journal of Clinical Oncology* 29, no. 6 (2011): 747-754.
- 16 Ozpolat, B., A. K. Sood, and G. Lopez-Berestein. "Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer." *Journal of internal medicine* 267, no. 1 (2010): 44-53.
- 17 Pecot, Chad V., George A. Calin, Robert L. Coleman, Gabriel Lopez-Berestein, and Anil K. Sood. "RNA interference in the clinic: challenges and future directions." *Nature Reviews Cancer* 11, no. 1 (2011): 59-67.
- 18 Kanasty, Rosemary L., Kathryn A. Whitehead, Arturo J. Vegas, and Daniel G. Anderson. "Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles." *Molecular Therapy* 20, no. 3 (2012): 513-524.
- 19 Peer, D., and J. Lieberman. "Special delivery: targeted therapy with small RNAs." *Gene therapy* 18, no. 12 (2011): 1127-1133.
- 20 Juliano, R. L., Xin Ming, Kyle Carver, and Brian Laing. "Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Oligonucleotides: Implications for Oligonucleotide Pharmacology." *Nucleic acid therapeutics* (2014).
- 21 Winkler, Johannes. "Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications." *Therapeutic delivery* 4, no. 7 (2013): 791-809.
- 22 Kesharwani, Prashant, Virendra Gajbhiye, and Narendra Kumar Jain. "A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA." *Biomaterials* 33, no. 29 (2012): 7138-7150.
- 23 Winkler, Johannes. "Nanomedicines based on recombinant fusion proteins for targeting therapeutic siRNA oligonucleotides." *Therapeutic delivery* 2, no. 7 (2011): 891-905.
- 24 Stumpp, Michael T., H. Kaspar Binz, and Patrick Amstutz. "DARPin: a new generation of protein therapeutics." *Drug discovery today* 13, no. 15 (2008): 695-701.

- 25 Binz, H. Kaspar, Patrick Amstutz, Andreas Kohl, Michael T. Stumpp, Christophe Briand, Patrik Forrer, Markus G. Grütter, and Andreas Plückthun. "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries." *Nature biotechnology* 22, no. 5 (2004): 575-582.
- 26 Simon, Manuel, Uwe Zangemeister-Wittke, and Andreas Plückthun. "Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries." *Bioconjugate chemistry* 23, no. 2 (2012): 279-286.
- 27 Winkler, Johannes, Patricia Martin-Killias, Andreas Plückthun, and Uwe Zangemeister-Wittke. "EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins." *Molecular cancer therapeutics* 8, no. 9 (2009): 2674-2683.
- 28 Munz, Markus, Patrick A. Baeuerle, and Olivier Gires. "The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling." *Cancer research* 69, no. 14 (2009): 5627-5629.
- 29 Went, Philip TH, Alessandro Lugli, Sandra Meier, Marcel Bundi, Martina Mirlacher, Guido Sauter, and Stephan Dirnhofer. "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." *Human pathology* 35, no. 1 (2004): 122-128.
- 30 Baeuerle, P. A., and O. Gires. "EpCAM (CD326) finding its role in cancer." *British journal of cancer* 96, no. 3 (2007): 417-423.
- 31 Roy, Subhadeep, and Marvin Caruthers. "Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries." *Molecules* 18, no. 11 (2013): 14268-14284.
- 32 Leuck, Michael, Rubina Giare, Nicole Zien, Matthias Paul, and Andreas Wolter. "A Novel Amino-ON CPG-Support for the Synthesis of 3'-Aminoalkylated Oligonucleotides." *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 24, no. 5-7 (2005): 989-992.
- 33 Ravi, Swathi, Venkata R. Krishnamurthy, Jeffrey M. Caves, Carolyn A. Haller, and Elliot L. Chaikof. "Maleimide–thiol coupling of a bioactive peptide to an elastin-like protein polymer." *Acta biomaterialia* 8, no. 2 (2012): 627-635.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

