



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Kovalente DARPin-Oligonukleotid Konjugate mit erhöhter Beladungskapazität für gezieltes Gene-Silencing“

verfasst von

Alexander Fischnaller

angestrebter akademischer Grad

Magister 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

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei Prof. Dr. Ernst Urban für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Chemie zu absolvieren, bedanken.

Vielen Dank an Dr. Johannes Winkler, der mir während meiner praktischen Tätigkeit mit vielen nützlichen Ratschlägen zur Seite stand und mir die Bearbeitung dieses interessanten Projektes ermöglichte.

Ein großer Dank gebührt Mag. Cornelia Lorenzer für die ausgezeichnete Betreuung bei der Durchführung meiner Versuche.

Weiters möchte ich mich bei Mag. Anna-Maria Winkler, Volker Baumann, MSC, DI Theresa Weigl-Pollack und Dr. Winfried Neuhaus bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin, die mich über die gesamte Dauer meines Studiums hinweg unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung.....	5
Abstract	6
1. Einleitung	7
1.1. RNA-Interferenz und small interfering RNA	7
1.2. RNAi basierte Therapie	9
1.3. Hürden der Therapie und Lösungsansätze	10
1.4. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin).....	11
1.5. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)	12
1.6. Kupferfreie „Click-Chemie“	13
2. Ziel.....	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1. Herstellung und Aufreinigung der Konjugate.....	15
3.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität.....	18
3.3. Fluoreszenzmarkierung der Konjugate.....	18
3.4. Analytik	19
3.5. Zellkulturversuche	22
4. Resultate	26
4.1. Herstellung und Aufreinigung der Konjugate.....	26
4.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität.....	39
4.3. Fluoreszenzmarkierung der Konjugate.....	42
4.4. Zellkulturversuche	45
5. Diskussion	55
5.1. Herstellung und Aufreinigung der Konjugate.....	55
5.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität.....	56
5.3. Analytik	57
5.4. Zellkulturversuche	57
5.5. Konklusion	59
6. Abkürzungsverzeichnis.....	61
7. Referenzen	62

Zusammenfassung

Therapeutisch genutzte Oligonukleotide, wie zum Beispiel small-interfering RNA und Antisense Oligonukleotide, bieten als Ergänzung zu den klassischen „small molecules“ eine interessante und moderne Alternative in der Behandlung hoch komplexer Krankheiten wie Krebs, genetischer Erbgutschädigungen und viraler Infekte.

Allerdings birgt die Injektion „nackter Nukleinsäuren“ häufig Risiken hinsichtlich ausgeprägter off-target Effekte, einer zu kurzen Halbwertszeit sowie einer zu geringen Zellaufnahme. Um diese Probleme zu umgehen, werden unter anderem verschiedene chemische Modifikationen am Oligonukleotid-Rückgrat synthetisiert, Lipid-basierte Trägersysteme, Nanopartikel sowie Biokonjugate entwickelt.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden stabile Konjugate aus verschiedenen Oligonukleotiden mit DARPins hergestellt. Diese „Designed Ankyrin Repeat Proteins“ besitzen die Möglichkeit, spezifisch an bestimmte Antigene zu binden.

Bei herkömmlichen Biokonjugationen kann pro Proteineinheit nur ein Oligonukleotid verknüpft werden, weshalb verschiedene „Linker“ (DNA-Tiles und sticky-siRNA) verwendet wurden, die es ermöglichen, das Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Protein zu erhöhen.

Die einzelnen Zwischenprodukte wurden charakterisiert und das fertige Produkt nach mehreren Reinigungsschritten in hoher Reinheit, die durch HPLC/FPLC und Gelelektrophorese überprüft wurde, erhalten.

Die Zellbindung des Konjugats sowie des kompletten Konstrukts mit DNA-Linkern war gleich stark wie für ein freies DARPIn.

Die Internalisierung wurde unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzmikroskopie sowie der Durchflusszytometrie beobachtet, allerdings konnten nur geringe Unterschiede zu den Kontrollen ohne DARPins gezeigt werden. Überraschenderweise war die Zellaufnahme, vermutlich ausgelöst durch den lipophilen Fluoreszenzfarbstoff, auch für nackte siRNA deutlich. Im Luciferasereportermodell konnte keine signifikante Down Regulation durch die Konjugate beobachtet werden.

Die Duplexbildung zwischen den verschiedenen Linkern zur Erhöhung der Beladungskapazität war schnell und stabil. Durch die relativ einfache Herstellung dieser Konjugate eröffnen sich neue Möglichkeiten des drug-targeting und die vorläufigen Daten lassen auf Strategien zur Entwicklung neuer Medikamente hoffen.

Abstract

Complementing small molecules, therapeutic oligonucleotides, e.g. small interfering RNA and antisense oligonucleotides provide new possibilities for the treatment of various - highly complex - diseases such as cancer, genetic disorders or viral infections.

However, injection of “naked nucleic acids” remains problematic concerning severe off target effects, a short half-life, as well as very poor cellular uptake. To mitigate these effects, chemically modified oligonucleotide-backbones, lipid based carrier systems as well as nanoparticles are in development.

This diploma thesis is engaged in the production, analysis and testing of different conjugates between oligonucleotides and DARPin. These “Designed Ankyrin Repeat Proteins” are able to bind specifically to Antigens. Their target EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) is up-regulated in various forms of cancer.

To a certain degree, “drug targeting” is realized this way and undesirable effects during therapy can be minimized.

Another problem of oligonucleotide-protein conjugates is the limited loading capacity. In standard bioconjugation schemes, each protein can hold only one nucleic acid at the same time. That is why different “linkers” like DNA-Tiles or sticky-siRNA were synthesized which gave us the opportunity of increasing the ratio between nucleic acid and protein.

Intermediate products were characterized and the final product successfully purified, confirmed by HPLC/FPLC and gel electrophoresis. Cell-binding was not interfered with by addition of the oligonucleotides, and unchanged compared to free DARPin.

Internalization of the product was demonstrated via fluorescence microscopy and FACS. Caused by surprisingly significant uptake of the siRNA alone, supposedly due to the lipophilic fluorescent dye, little differences to the conjugates could be detected. A difference in down-regulation compared to naked siRNA could not be observed in a luminescence reporter assay.

Duplex-assembling between different linker to increase the loading capacity is quick and stable.

Considering relatively easy synthesis of these conjugates, new opportunities regarding drug-targeting are available and this might lead to new possibilities in drug-development.

1. Einleitung

1.1 RNA-Interferenz und small interfering RNA

RNA-Interferenz ist ein entwicklungsgeschichtlich sehr alter Mechanismus in allen eukaryotischen Lebewesen einschließlich Pilzen, Pflanzen und Tieren. Sie dient dazu, zielgerichtet Gene abzuschalten und in weiterer Folge die Proteinexpression zu verhindern.¹

Unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe ist doppelsträngige RNA in der Lage, messenger RNA in einzelne Bruchstücke zu spalten und so die Genexpression zu unterbinden. Dieser Vorgang wird auch „posttranskriptionelles gene-silencing“ genannt.²

Für die Entdeckung dieser - vor allem in der Grundlagenforschung wichtigen - molekularbiologischen Methode, erhielten die beiden US-Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Medizin.

Trotz einiger Rückschläge befinden sich mehrere Wirkstoffe in klinischen Studien. Vor allem die altersbedingte Makuladegeneration, virale, kardiovaskuläre sowie neurodegenerative Krankheiten stehen im Moment im Fokus der angewandten Forschung.^{3,4,5}

Lange, doppelsträngige RNA wird vom Enzym „Dicer“ in kurze Fragmente mit einer typischen Länge von etwa 21 Basenpaaren geschnitten - small interfering RNA. Dicer ist ein Enzym aus der Gruppe der Endoribonukleasen, den RNasen III.^{6,7} Diese kurzen siRNA-Fragmente mit zwei Basenpaaren am 3' Ende als Überhang bilden nun einen Komplex mit einem Argonautenprotein, welcher zusammen mit anderen Enzymen als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichnet wird. Die doppelsträngige RNA wird von RISC in zwei separate einzelsträngige RNA, einen „guide strand“ und einen „passenger strand“ aufgetrennt. Der guide strand in Komplex mit RISC ist komplementär zur abzubauenen messenger-RNA und vermag diese an der Translation zu hindern.^{8,9}

Neben siRNA gibt es zwei weitere RNA-Typen, die durch RISC zum Gen-Silencing führen. Nämlich miRNA (micro-RNA) und shRNA (short hairpin RNA).¹⁰

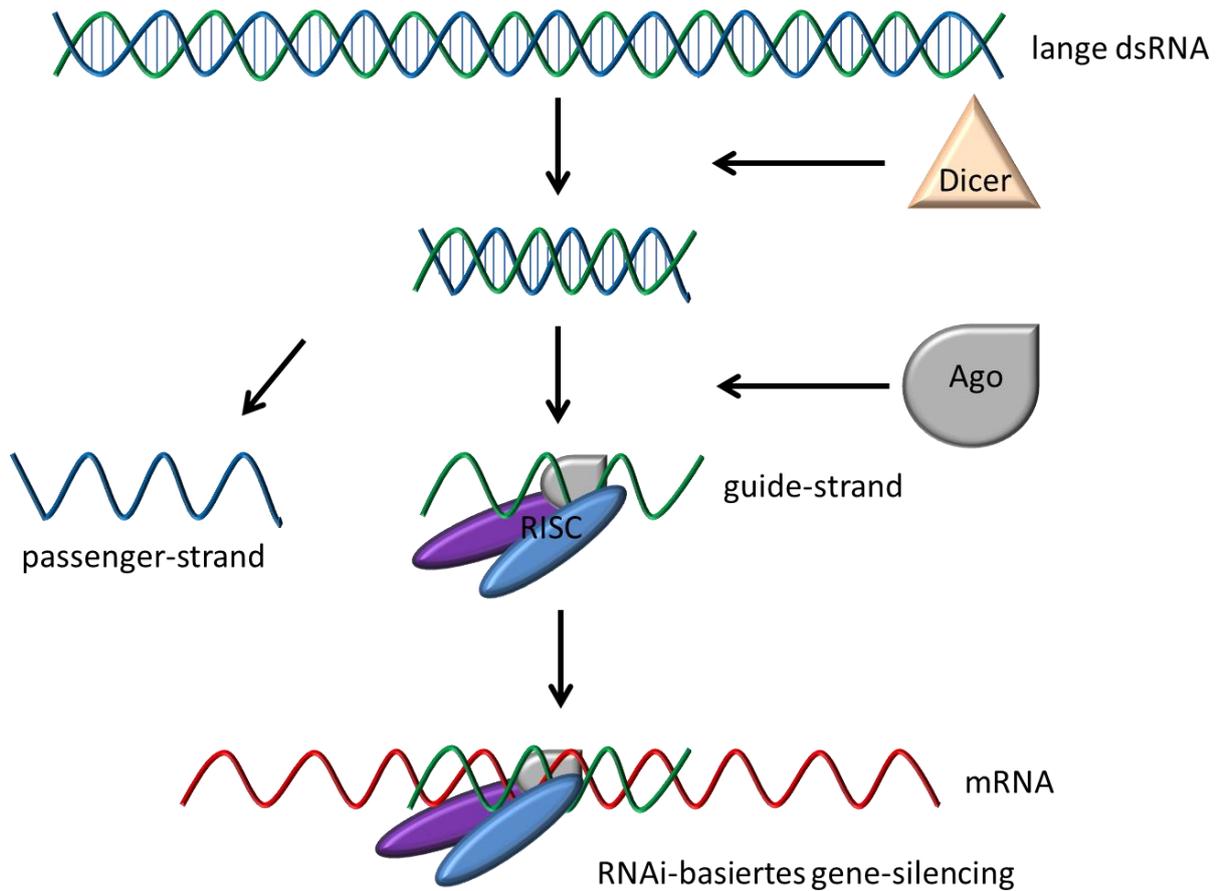


Abb. 1.01: Mechanismus des RNAi-basierten gene-silencing. Dicer schneidet lange doppelsträngige RNA in Bruchstücke. Argonautenprotein trennt den Duplex in guide und passenger strand. Ein RNA-induced silencing complex bildet sich und bindet an den komplementären Abschnitt der messenger-RNA.³⁹

1.2. RNAi – basierte Therapie

Neben der molekularbiologischen Grundlagenforschung spielt RNA-Interferenz auch in der Klinik eine immer größere Rolle. Ein Vertreter einer verwandten Technologie, Mipomersen, ein Antisense-Oligonukleotid, welches bei der Therapie der familiären Hypercholesterinämie zum Einsatz kommt, erhielt bereits 2013 die Zulassung.¹¹ Weitere auf RNAi basierende Medikamente befinden sich in klinischen Studien - so zum Beispiel Wirkstoffe gegen Krebs, virale Infekte, Hepatitis, altersabhängige Makuladegeneration, HIV oder rheumatoide Arthritis.¹²⁻¹⁶

Während fast alle in Verwendung befindlichen cytotoxischen Substanzen sich schnell teilende Zellen gleichermaßen schädigen, forscht man an Möglichkeiten mithilfe RNAi spezifisch Tumorzellen in ihrem Wachstum zu hindern. Hinsichtlich gravierender Nebenwirkungen in der heutigen Krebstherapie wäre diese Selektivität äußerst vorteilhaft.¹⁹ Hervorzuheben ist die rasche Synthese einer passenden siRNA. Sobald ein geeignetes Target gefunden wird, dauert es nur wenige Monate bis ein selektives Gene-Silencing verfügbar ist. Bei Small Molecules dauert dieser Prozess oft Jahre. In den letzten 15 Jahren wurden über ein Dutzend klinische Studien initiiert, insofern gilt RNAi als ein Hoffnungsträger der akademischen und industriellen Forschung.¹⁷

Trotz all dieser theoretischen Vorteile gilt es noch bedeutende Hürden zu überwinden, allen voran die ungenügende Stabilität gegenüber Serum-Nukleasen und die schlechte Zellaufnahme.^{18,19}

1.3. Hürden der Therapie und Lösungsansätze

So vielversprechend die Therapie mit RNA-Interferenz auch erscheint, die intravenöse Injektion „nackter“ siRNA ist nicht zufriedenstellend. Neben einer ungenügenden Stabilität gegenüber Serum-Nukleasen sowie schneller renaler Eliminierung und der damit verbundenen raschen Abnahme der Wirksamkeit spielen auch ausgeprägte off-target Effekte sowie eine zu geringe Zellaufnahme eine große Rolle. Mehrere Lösungsansätze zum gezielten Drug-Targeting werden im Moment erforscht.¹⁸⁻²⁰

Aufgrund der polyanionischen und hydrophilen Struktur der siRNA kann sie die Zellwand kaum durchdringen. Mithilfe chemischer Modifikationen versucht man die Zellaufnahme zu erhöhen, allerdings toleriert der RISC – Komplex nur sehr wenige Veränderungen.^{21,22} Mittels 2'-O-Methyl, 2'-Fluor, und einzelnen Phosphorthioatmodifikationen kann die Serumstabilität zufriedenstellend erhöht werden. Hauptaugenmerk der Forschung liegt im Moment auf der Entwicklung stabiler Transportsysteme, welche neben einer zielgerichteten Therapie auch weitere Sicherheitsaspekte erfüllen müssen.²³

Unter anderem wurden Lipid- und Polymer- basierte Trägersysteme entwickelt. Liposomale-, „stable nucleic acid lipid particle“ (SNALP) – Formulierungen, sowie ein Cyclodextrin-Nanopartikel befinden sich bereits in klinischen Studien.²⁴⁻²⁶ Außerdem besteht die Möglichkeit, durch Konjugationen mit receptorspezifischen Liganden die Zellaufnahme zu erhöhen. Eine solche Plattform, die N-Acetylgalactosamin(GalNAc)-Konjugate, wird bereits klinisch erprobt. Der Kohlenhydratligand ermöglicht die Aufnahme in Hepatozyten, die den entsprechenden Asialoglycoproteinrezeptor exprimieren. Erste klinische Ergebnisse, die kürzlich bekannt wurden, sind durchaus vielversprechend.

„Designed Ankyrin Repeat Proteins“ (DARPin) erwiesen sich als vielversprechende Möglichkeit, siRNA zielgerichtet zu transportieren. Mithilfe biotechnologischer Methoden ist es gelungen ein DARPin zu entwickeln, welches spezifisch an das Membranprotein „Epithelial Cell Adhesion Molecule“ (EpCAM) bindet. EpCAM wird in bestimmten Tumorarten (von epithelialeem Ursprung) überexprimiert und stellt ein geeignetes Transportziel dar.^{20, 27}

1.4. Designed Ankyrin Repeat Proteins

DARPinS zählen zu den Antigen-bindenden Proteinen, die mit Hilfe von Phagen- oder Ribosom-Display selektiv hergestellt werden können und in der Lage sind, mit hoher Affinität und Spezifität an prinzipiell jedes Protein-Zielmolekül zu binden.^{30, 31} Klassischen Antikörpern sind sie hinsichtlich Produktionskosten und Ausbeuten in *Escherichia coli* sowie durch ihre hohe thermodynamische und chemische Stabilität und einfachere Handhabung überlegen.

20, 29

Das Ankyrin Repeat Motiv besteht aus 33 Aminosäuren, welche eine Schleife, einen β -turn und zwei antiparallele α -helices formen. Sie besitzen für gewöhnlich kein Cystein; biotechnologisch eingebaut – wie im Falle des EC4 DARPinS am C-Terminus – ermöglicht Cystein die weitere seitenspezifische Modifikation des Proteins zum Beispiel über Sulfo-SMCC. Am N-Terminus kann anstelle des Methionins als erste Aminosäure ein Azido-homoalanin eingebaut werden.²⁸ Dies diente zur Verknüpfung des EC1-DARPinS an DBCO modifiziertes Oligonukleotid über eine Alkin-Azid Reaktion (Click-Chemie).



Abb. 1.02: Schematische Darstellung eines biotechnologisch modifizierten DARPins. Wenn am N-Terminus als erste Aminosäure Azido-homoalanin eingebaut wird, kann das DARPin über eine Alkin-Azid Reaktion mit DBCO-Oligonukleotid verknüpft werden. Ein Cystein am C-Terminus ermöglicht die Konjugation über Sulfo-SMCC. Abbildung adaptiert mit Erlaubnis von²⁸. Copyright 2012, American Chemical Society.

1.5 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

EpCAM, ein etwa 40 kDa schweres, glykosyliertes Membranprotein, ist physiologisch in verschiedenen Epithelgeweben, aber auch in Tumor-, Vorläufer- und Stammzellen vorhanden.³³ Es gilt als eines der am häufigsten und stärksten exprimierten bekannten Tumor-assoziierten Antigene. *In vivo* führt die Expression von EpCAM zu einer verminderten Zelldifferenzierung und gleichzeitig zu einer Erhöhung der epithelialen Proliferation. Zu beobachten ist dies bei vielen soliden Tumoren (z.B. Brust-, Rektum-, Prostata- und Lungenkarzinomen), die eine erhöhte EpCAM-Expression aufweisen. Im Gegensatz dazu sind alle Lymphome sowie auch die Mehrheit der Tumore, die Weichteilgewebe betreffen, EpCAM-negativ. In somatischem Gewebe findet sich EpCAM ausschließlich in epithelialen Zellen.

Als Membranprotein ist EpCAM sowohl Rezeptor als auch Zelladhäsionsmolekül und spielt eine Rolle bei der Gentranskription und Zellproliferation. Die Expression von EpCAM in verschiedenen Krebszellen sowie Krebsstammzellen und dessen proliferationsfördernde Rolle machen das Molekül als Target bei der Entwicklung neuer Krebs-Medikamente interessant.^{32, 33, 34}

1.6. Kupferfreie Click-Chemie

Die klassische (Kupfer-katalysierte) Click-Chemie verläuft schnell, stereospezifisch und effizient. Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden hat sich als Standard etabliert.



Abb. 1.03: Huisgen Cycloaddition (1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Alkin und Azid)

Neben der Synthese großer Substanz-Bibliotheken lassen sich mithilfe der Click-Chemie auch neue Biokonjugate, Polymer-basierte Therapeutika oder Drug-Delivery-Systeme entwickeln.^{35, 41}

Nachteilig ist allerdings die Verwendung eines Kupfer-Katalysators, welcher toxisch für Bakterien und Zellen ist, und oft nur mühsam vollständig vom Endprodukt abgetrennt werden kann. Unterschiedlich substituierte Cyclooctine wurden entwickelt, um die Click-Chemie unter katalysatorfreien und physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.^{36, 37}

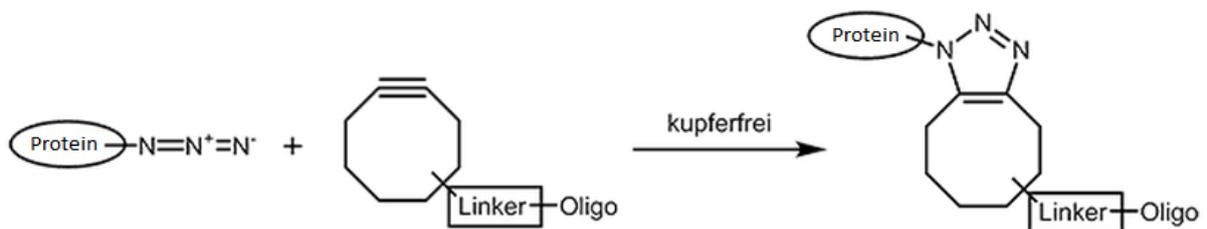


Abb. 1.04: Schematische Darstellung der kupferfreien Click-Chemie zwischen Protein und Oligonukleotid

2. Ziel

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten verschiedene Möglichkeiten der Konjugation von modifizierten Oligonukleotiden an DARPin getestet werden. Neben der „klassischen“ Amid-Maleimid Bindung über Sulfo-SMCC, ist auch die „kupferfreie Click-Chemie“ Teil dieses Projekts.

Anschließend sollte die Beladungskapazität für Oligonukleotide erhöht werden, indem „DNA-Tiles“ oder sticky-siRNA über Duplexbildung an das fertige Konjugat geknüpft werden.

Nach der Umsetzung von $dT_{18-3'}NH_2$ mit Sulfo-SMCC sollte das Produkt aufgereinigt und mit monomerem EC4-Cys (Protein) über eine Maleimidfunktion verknüpft werden. Mittels RP-HPLC/FPLC sowie Gelelektrophorese sollte die Reinheit kontrolliert und anschließend über Duplexbildung an siRNA gekoppelt werden, um die Bindungsfähigkeit sowie die Downregulation auf Zellkulturen zu testen.

Für die Click-Chemie sollten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden sowie Vorteile gegenüber der klassischen Konjugation erprobt werden. In dieser Arbeit wird biotechnologisch modifiziertes EC1-DARPin verwendet, in welches als N-terminale Aminosäure anstelle Methionins ein Azido-Homoalanin eingebaut wurde. Damit sollte die Alkin-Azid Verknüpfung mit einem DBCO-modifiziertem Oligonukleotid realisiert werden. Nach der anschließenden Aufreinigung sollte das Konjugat mit DNA-Tiles und Sticky-siRNA konjugiert, und auf Zellkulturversuchen hinsichtlich Zellbindung und Zellaufnahme getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Herstellung und Aufreinigung des Sulfo-SMCC Konjugates

Das 3'-Aminoethyl-modifizierte Oligonukleotid Desoxythymidin-18mer (dT₁₈) wurde mithilfe eines Polygen Synthesizers und des Phosphoramidit-Verfahrens hergestellt und nach der Standardmethode aufgereinigt.³⁹ Eine HPLC wurde zur Reinheitskontrolle angefertigt (siehe 3.4.1).

3.1.1 Konjugationsreaktion über Sulfo-SMCC

Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-N-maleimidomethyl-cyclohexan-1-carboxylat) wurde von der Firma Thermo-Scientific erworben und eine 10 mM Lösung frisch zubereitet. Dazu wurden 2,0 mg Sulfo-SMCC in 458 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

20 nmol dT18-3'NH₂ wurden mit 1000 nmol (50x Überschuss) Sulfo-SMCC sowie 10x PBS-Puffer (pH 7,7; finale Konzentration = 5x PBS) versetzt und bei 350 RPM / 25°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitspannen wurden Proben gezogen und mittels HPLC analysiert.

3.1.2. Aufreinigung mittels FPLC

Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges Sulfo-SMCC sowie Hydrolyseprodukte mithilfe einer Äkta Pure 25 Größenausschlusschromatographie von GE Healthcare abgetrennt. Folgende Einstellungen wurden an der FPLC vorgenommen:

Bedingungen FPLC	
Säule	Superdex 75 / 300 (GE Healthcare)
Puffer	5x PBS, pH 7,2 (Gibco)
Flussrate	0,5 ml/min
Absorptionswellenlängen	260 nm, 280 nm, 230 nm
Fraktionsgröße	0,5 ml

Tabelle 1: Einstellungen der FPLC zur Abtrennung des Überschusses Sulfo-SMCC sowie der durch die Reaktion entstandenen Hydrolyseprodukte.

Die Fraktionen wurden aufgefangen und separat mittels HPLC erneut analysiert.

3.1.3. Reduktion EC4-Cys Dimer zu Monomer

Durch die Cystein-Modifikation am C-Terminus unterliegt das Protein einer Dimerisierung durch Disulfidbrückenbildung. Um diese aufzubrechen, wurde eine frische 250 mM Lösung von Dithiothreitol (DTT) in RNase freiem Wasser hergestellt. Im Verhältnis 1:25 wurde EC4-Cys mit DTT versetzt (finale Konzentration = 10 mM) und bei 37°C unter leichtem Schütteln 30 Minuten inkubiert. DTT wurde durch eine Sephadex G25 Säule entfernt, die Fraktionen vereint und die Konzentration mittels NanoDrop spektrophotometrisch über die Absorption bei 280 nm (spezifisch für Proteine) mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

3.1.4. Reaktion dT₁₈-3'SSMCC mit EC4-Cys

7 nmol reduziertes EC4-Cys wurden mit einem 1,1-fachen Überschuss (8.47 nmol) dT₁₈-3'-Sulfo-SMCC versetzt. Mittels 10x PBS (Gibco), pH 7,25, wurde auf eine finale Konzentration von 5x PBS gepuffert. Nach 16,5 Stunden und 23 Stunden wurde der Reaktionsverlauf mittels RP-HPLC Messungen kontrolliert. Für die Reinheitsüberprüfung wurden gelelektrophoretische Methoden durchgeführt.

3.1.5. Aufreinigung des Konjugates mit Nickel-NTA

1 µl Nickel-NTA ist in der Lage, etwa 2 µg Protein zu binden. 131,95 µg Konjugat (7 nmol bezogen auf EC4-Cys) wurde mit 80 µl Ni-NTA versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde überschüssiges Oligonukleotid mit 1x PBS abgewaschen. Dazu wurde die Probe in spin-columns (20 µm Receiver Columns von Macherey-Nagel) überführt und es wurde mit je 100 µl Waschlösung zentrifugiert.

Das Konjugat wurde mittels 250 mM Imidazol in RNase freiem Wasser eluiert, die Fraktionen vereint, bei Bedarf einrotiert und am NanoDrop bei 260/280 nm vermessen. Mithilfe einer geeigneten Berechnungsmethode basierend auf den Extinktionskoeffizienten der Komponenten bei diesen Wellenlängen kann man annäherungsweise die Konzentration an fertigem Konjugat berechnen.

3.1.6. Endaufreinigung mittels komplementärer - biotinylierter DNA

Um Produkt von unreaktiertem Protein abzutrennen, wurde dA_{18} (beziehungsweise dT_{18} im Falle des DBCO-Konjugates) an Biotin gekoppelt und anschließend an Streptavidin-Sepharose geknüpft. Über Duplexbildung bindet $dT_{18_SMCC_EC4}$ an die Matrix und kann durch unterschiedliche Salzkonzentration des Elutionspuffers abgewaschen werden.

1,0 mg NHS-Biotin wurde in 224 μ l RNase freiem Wasser gelöst ($c=10$ mM). 20 nmol dA_{18} (200 μ l) wurden mit 200 μ l 10 x PBS gepuffert (Endkonzentration = 5x PBS) und mit 50-fachem Überschuss an NHS-Biotin versetzt (1000 nmol). Durch HPLC wurde der Verlauf kontrolliert und überschüssiges Biotin mit Sephadex G25 abgetrennt.

Zunächst musste die Probe auf 500 mM NaCl (in Wasser) umgepuffert werden. Anschließend inkubierte man die, mit 500 mM NaCl gewaschene, Sepharose-Streptavidin-Biotin- dA_{18} Säule mit Konjugat und schüttelte 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde mit 500 mM NaCl – Lösung solange gewaschen, bis Absorptionsmessungen am NanoDrop das Fehlen von gelösten Substanzen anzeigten (~ 500 μ l). Nun konnte die Probe unter Erwärmen auf $\sim 60^\circ\text{C}$ mit 50 mM NaCl (in Wasser) eluiert werden. Die einzelnen Fraktionen zu je 150 μ l, die Produkt enthielten, wurden vereint, am NanoDrop vermessen und mittels Gelelektrophorese analysiert.

3.1.7. Konjugationsreaktion über „Klick-Chemie“

Für die Klick-Chemie-Konjugation wurde DBCO- dA_{18} sowie EC1 verwendet. Dibenzylcyclooctin – dA_{18} wurde von der Firma Microsynth gekauft. EC1-DARPin ist am N-Terminus modifiziert, anstelle von Methionin wurde durch metabolisches Engineering als erster Aminosäurebaustein Azido-Homoalanin eingebaut. Über eine Alkin-Azid Reaktion wird dA_{18} an EC1 gebunden.

18 nmol EC1-Protein wurden mit 20 nmol DBCO- dA_{18} (bezogen auf Gesamtmenge Oligonukleotid - Anteil an DBCO- dA_{18} $\sim 45\%$), RNase-freiem Wasser sowie 10x PBS-Puffer (finale Konzentration = 5x PBS; $\text{pH}=7,7$) versetzt und bei 25°C und 350 RPM am Schüttler inkubiert. Die Verlaufskontrolle erfolgte mittels RP-HPLC. Die Ausbeute betrug zirka 50%. Überschüssiges DBCO- dA_{18} wurde mittels Sephadex G25 Säule entfernt. Die weitere Aufreinigung zum finalen Produkt erfolgte gleich wie die des Sulfo-SMCC Konjugates. (Siehe 3.1.5.)

3.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität

3.2.1. Konjugation mit sticky-siRNA und DNA-Tiles

Die Duplexbildung der sticky-siRNA und DNA-Tiles an das fertige Konjugat wurde durch Gelelektrophorese (native Oligogele, als auch Agarosegele) kontrolliert.

Die Konjugate wurden äquimolar mit sticky-siRNA Sense- und Antisense-Strang versetzt. Auch ein vierfacher Überschuss an sticky siRNA wurde gewählt, um verschiedene Stadien der Multimerisierung (Überlappung der sticky siRNA) zu testen.

Bei den DNA-Tiles (4-Arm Spacer) wurde jeweils die gleiche molare Menge verwendet. Beispielsweise 100 pmol EC1-Konjugat wurden mit je 100 pmol Tile1, 100 pmol Tile2, 100 pmol Tile3 und 100 pmol Tile4 versetzt.

Um die Duplexbildung zu vereinfachen, wurden die einzelnen DNA-Tiles, als auch die sticky-siRNA zunächst in wenig 1x PBS-Puffer vereint, für wenige Minuten auf ~60°C erwärmt und langsam abgekühlt. Erst im Anschluss wurde das Konjugat zupipettiert und nach 5 Minuten bei Raumtemperatur auf Eis gestellt.

3.3. Fluoreszenzmarkierung der Konjugate

Zur weiteren Analyse, zum Beispiel auf Zellkulturen, mussten die hergestellten Substanzen fluoreszenzmarkiert werden. Für die Markierung der EC4-Konjugate wurde Alexa Fluor® 568 von der Firma Life Technologies verwendet. Ein Cy3-markiertes Oligonukleotid, welches komplementär zu DNA-Tile 3 war, wurde von der Firma Microsynth käuflich erworben.

9 nmol dA₁₈ wurden mit Alexa Fluor® 568 Farbstoff nach Herstellervorschrift versetzt und über Nacht konjugiert. Mittels HPLC wurde das Ergebnis kontrolliert. Überschüssiger Farbstoff wurde über eine Sephadex G50 Säule entfernt. Oligogele wurden zur Kontrolle hergestellt.

3.4. Analytik

3.4.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Shimadzu Prominence HPLC diente vor allem der Verlaufskontrolle der einzelnen Reaktionsschritte sowie der Reinheitsprüfung der Konjugate. Als Software benutzten wir Shimadzu LC solution. Stationäre Phase war eine - auf 25°C temperierte - Clarity 5u oligo RP18-Säule von Phenomenex. Mobile Phase A war eine 50 mM Triethylammoniumacetat-Lösung, mobile Phase B Acetonitril. Der UV-Detektor wurde auf 260 und 280 nm eingestellt.

2 verschiedene Methoden der Gradientenelution wurden verwendet:

Methode A			Methode B		
Zeit (min)	Laufmittel A	Laufmittel B	Zeit (min)	Laufmittel A	Laufmittel B
0	95	5	0	95	5
5	95	5	5	95	5
30	70	30	60	40	60
32	35	65	62	35	65
37	95	5	67	95	5

Tabelle 2: Unterschiedliche Methoden der Gradientenelution bei der HPLC

3.4.2. Gelelektrophorese

Um die Reinheit der Konjugate zu verifizieren, wurden denaturierende Oligo- und Proteingele angefertigt. Die Duplexbildung mit DNA-Tiles beziehungsweise sticky-siRNA wurde auf nativen Oligogelen getestet.

3.4.2.1. SDS-Polyacrylamidgel (Proteingel)

Proteine, und somit auch die Konjugate, können mithilfe eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels analysiert werden. Die folgenden Mengen beziehen sich jeweils auf die Herstellung von zwei Gelen:

Für das Trenngel wurde in einem Becherglas 3,44 ml Wasser bidest., 2,50 ml 4x Trennpuffer (1,5 M Tris-HCl, SDS, pH 8,8), 4 ml 30 % Acrylamid-Lösung, 50 µl 10 % APS (10 %ige Ammoniumperoxodisulfat Lösung) und 6,67 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin) vereinigt und mit einer Pipette in die Apparatur gegossen. Um eine schöne Grenzfläche zu erhalten, wurde mit Butanol überschichtet und etwa zwei Stunden stehen gelassen, Butanol abgegossen und das Sammelgel hergestellt. Dafür wurde 2,46 ml Wasser

bidest., 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 vermischt und auf die zwei vorbereiteten Trenngele gegossen.

Mit einem Kamm wurden Taschen geformt. Die Proben wurden kurz auf 95°C erhitzt und pro Tasche 5 µg (bezogen auf Protein) mit Lämmli-Puffer (2 % SDS, 60 mM Tris-Cl, 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau in Wasser) gemischt und aufgetragen. Als Proteinstandard wurde PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific verwendet. Puffersystem war 1 x Kathodenpuffer innen und 1 x Anodenpuffer außen. Bei einer Spannung von 150 V wurde rund 1 Stunde laufen gelassen. Zur anschließenden Färbung wurde Coomassie-Lösung (0,1 % Coomassie-Blue, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % Wasser bidest.) verwendet. Entfärbt wurde mit Coomassie-Destaining-Solution. (10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % Wasser bidest.) Fotografiert wurde das Gel mittels GS-710 Calibrated Imaging Densitometer von Bio-Rad und das Bild mit der zugehörigen Software Quantity One 4.6.3 bearbeitet.

3.4.2.2. Harnstoff-Polyacrylamidgel (Oligogel)

Um die Reinheit der Oligonukleotide nachzuweisen, wurden Oligogele (20%ige Harnstoff-Polyacrylamidgelle) verwendet. Zur Herstellung 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 vermischt und in der Mikrowelle kurz erwärmt, um den Harnstoff vollständig zu lösen. 75 µl APS und 7,5 µl TEMED wurden zum Starten der Polymerisationsreaktion zupipettiert und in die Apparatur gegossen. 10 Taschen wurden mit einem Kamm geformt. Nach etwa zwei Stunden wurde das leere Gel für 30 Minuten bei 150V vorlaufen gelassen. Puffer war 1 x TBE. Die Proben wurden mit 1 x DNA-Loading Dye (Formamidpuffer, Xylencyanol und Bromphenolblau) gemischt und nach dem Erhitzen auf 95°C aufgetragen. Als Standard wurde eine Mischung aus Formamidpuffer, Xylencyanol und Bromphenolblau (6x DNA-Loading Dye) verwendet. Das beladene Gel wurde so lange laufen gelassen, bis Bromphenolblau etwa 2/3 der Laufstrecke erreicht hatte. Zur Färbung diente 0,02 % Methylenblaulösung in TBE. Nach 30 Minuten wurde mit Wasser entfärbt. Zum Scannen wurde der GS-710 Calibrated Imaging Densitometer von der Firma Bio-Rad verwendet und das Bild mit der zugehörigen Software Quantity One analysiert.

3.4.2.3. Natives Polyacrylamidgel

Das native Polyacrylamidgel diente zur Analyse der hybridisierten Oligonukleotidstränge. Vor allem die Duplexbildung zwischen Konjugat und fluoreszenzmarkierten Strängen musste nachgewiesen werden. Ebenso die richtige (Selbst-)assemblierung der DNA-Tiles / Sticky-siRNA.

Zur Herstellung der Gele wurde in einem Becherglas 3,75 ml 40 %ige Acrylamid - Stammlösung, 1,5 ml 10x TBE, 6 ml Wasser, 7,5 µl TEMED und 75 µl APS 10 % gemischt und in die Apparatur gegossen. Die Taschen wurden mit einem Kamm geformt. Nach der Polymerisation erfolgte der Vorlauf des Gels bei 150 V für eine halbe Stunde. Während der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Kammer auf Eis gelagert. Zur Assemblierung der DNA-Stränge wurden sie auf 60°C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ladepuffer besteht aus Wasser bidest. und 80 % Glycerin. Mit diesem wurden die Proben auf je 15 µl aufgefüllt. Als Standard wurde DNA Loading Dye verwendet. Die Proben wurden bei 150 V so lange laufen gelassen, bis der Standard 2/3 der Gelstrecke erreicht hatte.

Zur Fluoreszenzanregung und Auswertung wurde ein Ettan DIGE Imager von GE Healthcare verwendet. Kanal Cy3 sowie verschiedene Belichtungszeiten wurden für eine optimale Aufnahme gewählt. Mithilfe der mitgelieferten Software wurden die Gele dokumentiert und ausgewertet.

3.4.2.4 Native Agarosegelelektrophorese (2%)

Native Agarosegele wurden ebenfalls zur Kontrolle der Hybridisierung verwendet. 0,8 g Agarose wurden in 40 ml 1 x TBE in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und mit 4 µl Ethidiumbromid gemischt. Die Form wurde gegossen und die Taschenschablonen eingesetzt. Die Erstarrung dauerte etwa eine Stunde. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf 60°C erhitzt und langsam abgekühlt, um eine Selbstassemblierung zu gewährleisten. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6 x DNA Loading Dye gemischt und in die Taschen pipettiert. Als Standard wurde GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder der Firma Thermo Scientific verwendet. Puffer war eisgekühltes 1 x TBE. Bei 80 V wurde so lange laufen gelassen, bis die Banden etwa die Hälfte der Laufstrecke erreicht hatten. Anschließend wurde mit dem ChemiDoc™ XRS der Firma Bio Rad das Bild mit Quantity One analysiert.

3.5. Zellkulturversuche

3.5.1. Durchflusszytometrie - FACS

Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS) wurde zur Kontrolle der Zellbindung herangezogen. Mithilfe eines fluoreszenzmarkierten DNA-Stranges und eines fluoreszenzmarkierten Penta-His-Tag Antikörpers konnte getestet werden, ob das DARPin an MDA-MB-468 Zellen erfolgreich gebunden hat. Während der EC4 Antikörper lediglich die Bindung des Proteins beweist, konnte mithilfe eines fluoreszenzmarkierten DNA-Stranges das gesamte Konjugat getestet werden.

3.5.1.1. Herstellung der Konjugate mit fluoreszenzmarkierter DNA

Die beiden Konjugate wurden sowohl mit sticky-siRNA als auch mit dem 4-Arm-Spacer getestet. Unterschiedliche fluoreszenzmarkierte DNA-Stränge waren hierzu notwendig. Zur Markierung der sticky-siRNA wurde dA₁₈-Alexa Fluor® 568 verwendet. Für den 4-Arm-Spacer wurde ein Cy3 markiertes Oligonukleotide von Microsynth verwendet, welches komplementär zu DNA-Tile 3 war. Zur Herstellung der Duplexe wurden Konjugat und fluoreszenzmarkierter DNA-Strang jeweils äquimolar gemischt, kurz auf etwa 50°C erwärmt und lichtgeschützt auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.5.1.2. Vorbereiten der Zellen für den FACS-Versuch

Das Zellmedium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach der erneuten Resuspension in Medium wurden die Zellen mithilfe einer Zählkammer gezählt und 5 Minuten bei 1000 RPM und 37°C zentrifugiert. Der Waschvorgang mit PBS wurde wiederholt und die Zellen anschließend in 1 x PBS + 1% FCS (=FACS-Puffer) so suspendiert, dass eine Zellzahl von 1.636.363 Zellen/ml erreicht wurde. Dies entsprach 180.000 Zellen pro 110 µl Suspension.

3.5.1.3. Probenvorbereitung mit Penta-His-Tag Antikörper

110 µl Zellsuspension wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit Konjugat gemischt. Die Konjugate wurden zuvor separat hergestellt. Nach einer Stunde Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen mit je 1 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und 10 Minuten bei 4°C und 1000 RPM zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Danach wurden die Zellen in 200 µl kaltem FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 2 µl des Antikörpers Penta-His Alexa

Fluor 488 Conjugate™ (c=200 µg/ml) der Firma Qiagen zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde auf Eis, wurden die Proben erneut zweimal gewaschen und in 500 µl kaltem FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen auf Eis bis zur Messung gelagert.

3.5.1.4. Probenvorbereitung mit Fluoreszenzmarkierten DNA-Strängen

110 µl Zellsuspension wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und mit den bereits zuvor hergestellten (mit Fluoreszenzfarbstoff markierten) Konjugaten gemischt, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. (Siehe 3.5.1.3.) Anschließend in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

3.5.2. Luciferase-Assay

Um eine Herunterregulation der Proteinexpression zu kontrollieren, wurde ein Luciferase-Test durchgeführt.

Dazu wurde das Sulfo-SMCC Konjugat mit sticky-siRNA verknüpft und mit Opti-Mem® der Firma Gibco auf verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die sticky-siRNA stellte eine anti-Luciferase siRNA dar. Als Zelllinie diente SW 480-pEGFP-Luc³⁸, welche über ein Luciferase-Reportergen verfügt. Die Messungen wurden mit einem Tecan infinite M200Pro durchgeführt und mit der Tecan i-control Software ausgewertet. Die Zellkulturmedien stammten von GIBCO und PAA, die 96-Well Platten von Greiner Bio-One, Lipofectamin RNAiMAX-Transfektionsreagens von Life Technologies.

3.5.2.1. Herstellung des Sulfo-SMCC Konjugates mit ssiRNA

Hergestelltes EC4_Sulfo-SMCC_dT₁₈ Konjugat wurde mit Anti-Luciferase sticky-siRNA äquimolar versetzt, eine Minute auf 60°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Anti-Luciferase sticky-siRNA ohne Konjugat diente zur Kontrolle und wurde ebenfalls bereit. Die Lösungen wurden mit Optimem auf 100 pM eingestellt und anschließend weiter verdünnt. Als Transfektionsreagens für die nackte sticky-siRNA wurde 0,3 µl RNAiMAX pro pmol verwendet.

3.5.2.2. Vorbereitung der SW480 Zellen und Inkubation

Die Zellen wurden mit DMEM GlutaMAX™ Medium (+10 % FCS) auf 312.500 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden 80 µl mit den vorbereiteten Proben gemischt, auf die Platte aufgetragen und 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.5.2.3. Zellyse

Die Flüssigkeit in den Wells wurde abgesaugt und mit 100 µl PBS gewaschen. Mit 20 µl 1 x passivem Lysepuffer der Firma Promega wurden die Zellen lysiert und bei Raumtemperatur eine halbe Stunde geschüttelt.

3.5.2.4. Bradford-Assay

Da nicht alle Wells die gleiche Zellzahl enthielten, wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, die Lumineszenzmessung nicht durch unterschiedliche Zelldichten zu verfälschen. Zur Erstellung der Eichgerade wurde in eine transparente 96-Well Platte 0, 2, 5 und 10 µl BSA (1 mg protein / ml) pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Aus den Zelllysaten wurde je 1 µl entnommen, in die Platte pipettiert und ebenfalls auf 20 µl aufgefüllt.

3.5.2.5. Lumineszenzmessung mittels Tecan-Scanners

Luciferase Reagens II der Firma Promega wurde in den Injektor des Tecan-Scanners gestellt. 50 µl Reagens wurden vollautomatisch in jedes Well pipettiert und die Lumineszenz sofort vermessen.

3.5.3. Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Zellaufnahme

Um die Zellaufnahme sichtbar zu machen, wurde das EC1 Konjugat mit dem 4 Arm Spacer verknüpft, fluoreszenzmarkiert und auf MDA-MB-468 Zellen aufgebracht. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit Fotos aufgenommen und ausgewertet.

3.5.3.1. Herstellung der Konjugate

DNA Tile 1 bis Tile 4 wurden in wenig 1x PBS vereint, auf 60°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das EC1 Konjugat und Cy3-Fluoreszenzfarbstoff der Firma Microsynth hinzugefügt und nach 5 Minuten bei Raumtemperatur auf Eis gestellt. Die hergestellte Stock-Solution wurde mit Opti-Mem® der Firma Gibco verdünnt und auf 48-Well Platten in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen.

3.5.3.2. Vorbereiten der MDA-MB-468 Zellen und Auswertung

Die Zellen wurden in DMEM GlutaMAX™ der Firma Gibco (+10% FCS) suspendiert, sodass eine Zellzahl von 400.000 Zellen / ml erreicht wurde. Pro Well wurden 200 µl aufgetragen, was einer Zellzahl von 80.000 Zellen entsprach. Gemeinsam mit der Probe wurde die Platte bei 37°C inkubiert und nach 48 Stunden ausgewertet.

Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Evos fl, Life Technologies) wurden die einzelnen Wells fotografiert. Durch die spezifische Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes angeregte Zellen wurden durch Overlay mit normalbelichteten Zellen verglichen und ausgewertet.

3.5.3.3. FACS-Versuch auf Zellaufnahme

Im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen trypsinisiert, gewaschen (siehe 3.5.1.2.) und am FACS auf Zellaufnahme getestet.

4. Resultate

4.1. Herstellung und Aufreinigung des Sulfo-SMCC Konjugates

4.1.1 Reaktion dT₁₈-3'NH₂ mit Sulfo-SMCC

Amino-modifiziertes dT₁₈ wurde mit einem 50fachen Überschuss an Sulfo-SMCC in PBS-Puffer (pH 7,7; Endkonzentration = 5x PBS) gemischt und bei 25°C / 350 RPM am Schüttler inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion beendet und eine HPLC angefertigt. Die Ausbeute betrug bezogen auf dT₁₈ rund 75%.

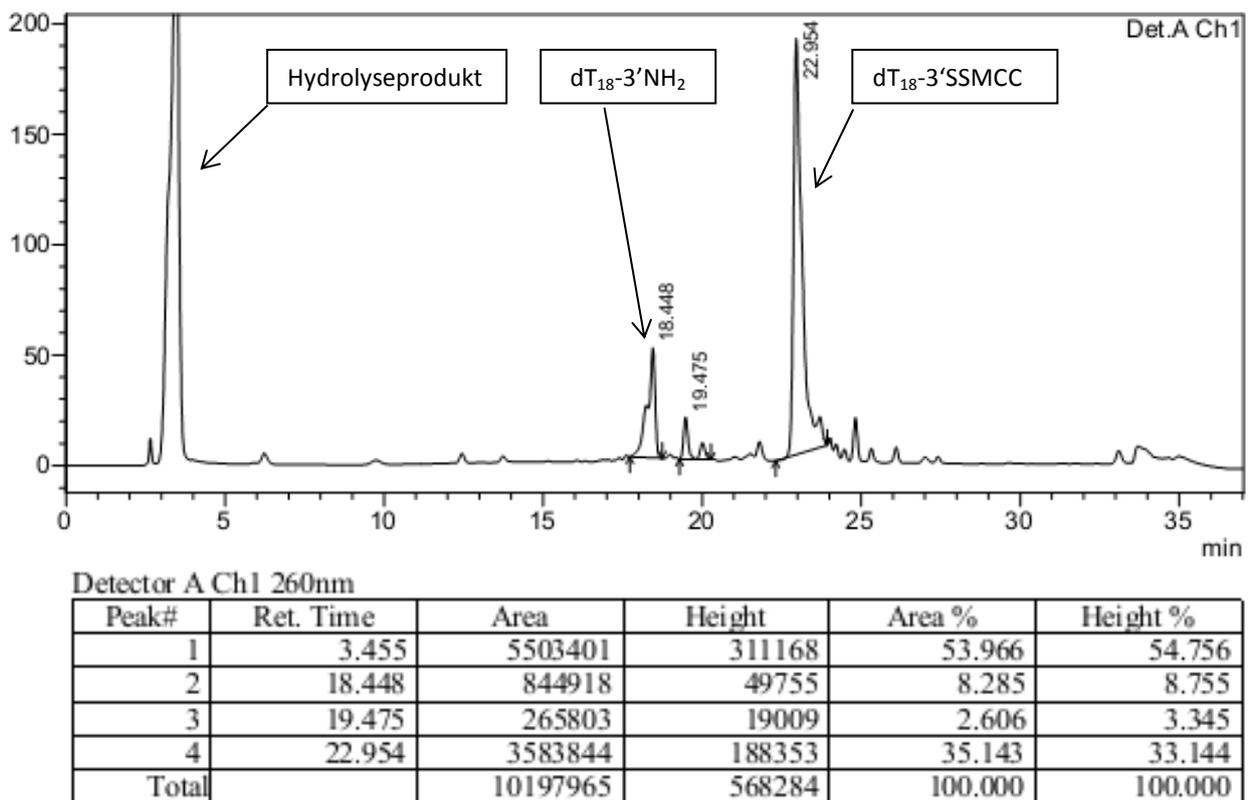


Abbildung 4.01: HPLC der Reaktion zwischen dT₁₈-3'NH₂ und Sulfo-SMCC nach 2 Stunden. (5-30% ACN - Methode A) Der Peak bei 3,4 min stellt Hydrolyseprodukt des NHS-Esters dar, welches für die weiteren Reaktionen abgetrennt werden musste. Das 3'-Amino-Oligonukleotid hat eine Retentionszeit von ~18,4 min, das 3'-Sulfo-SMCC-Oligonukleotid erscheint nach etwa 23 min. Die Ausbeute betrug rund 75%.

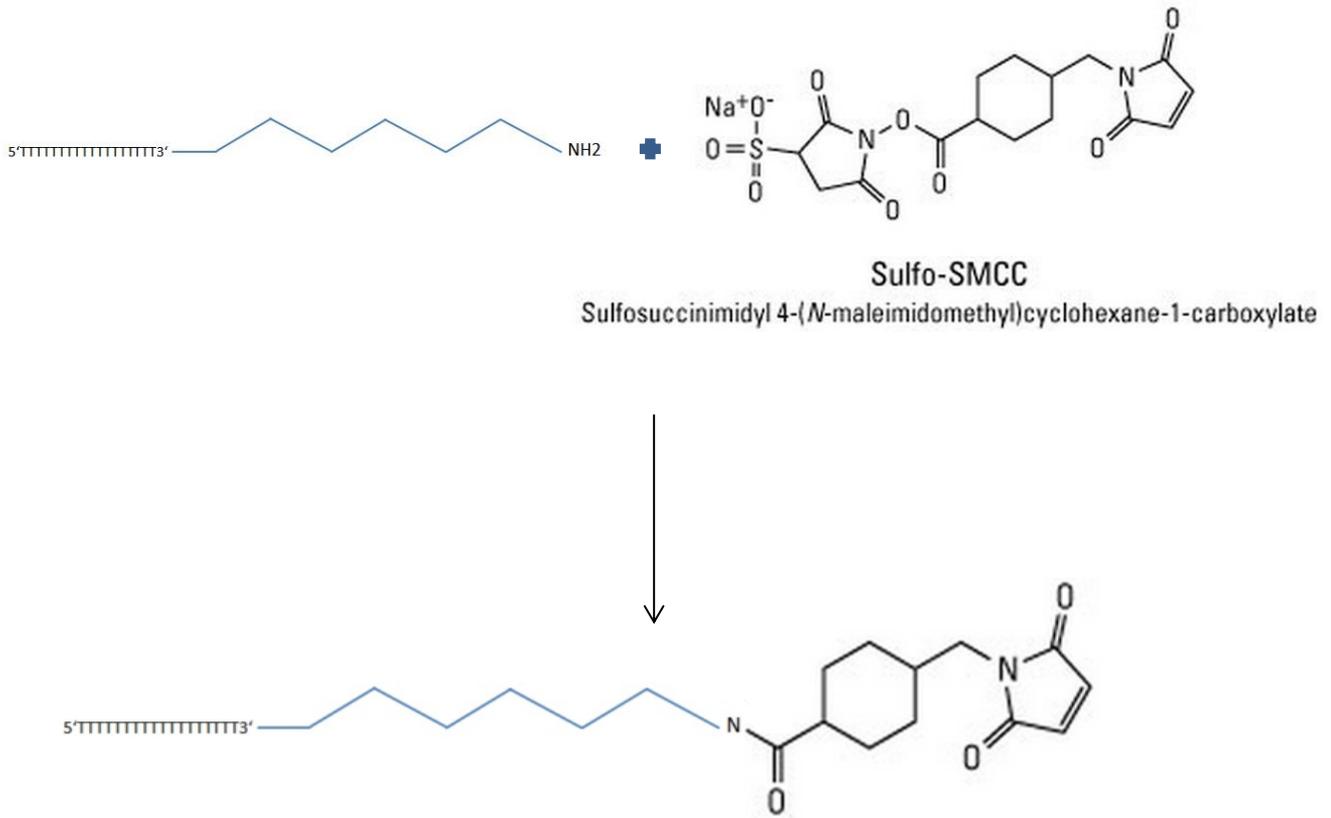


Abb. 4.02: Die Herstellung des dT₁₈-3'Sulfo-SMCC Konjugates begann mit der Verknüpfung von dT₁₈-3'NH₂ mit Sulfo-SMCC. Nach zwei Stunden am Schüttler wurde die Reaktion beendet und durch RP-HPLC analysiert. Die Aminohexyl-Gruppe am 3' Ende des Oligonukleotids ist für die Ausbildung der Amidbindung mit dem N-Hydroxysuccinimidester des SMCC-Linkers essentiell.

4.1.2. Aufreinigung mittels FPLC

Um überschüssiges Sulfo-SMCC sowie Hydrolyseprodukte abzutrennen, wurde das Reaktionsgemisch mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt, die einzelnen Fraktionen aufgefangen und separat mittels RP-HPLC Messungen identifiziert.

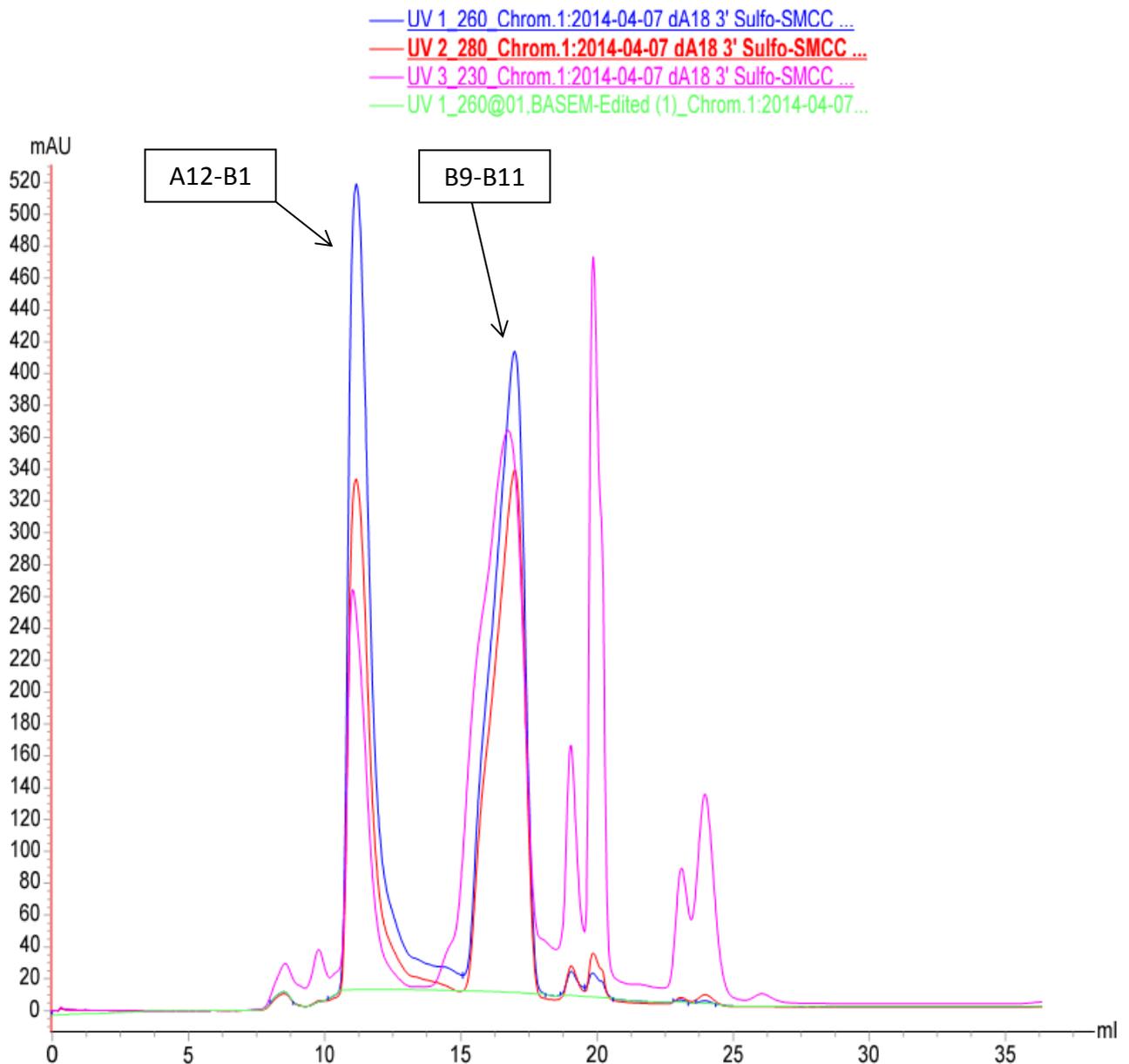
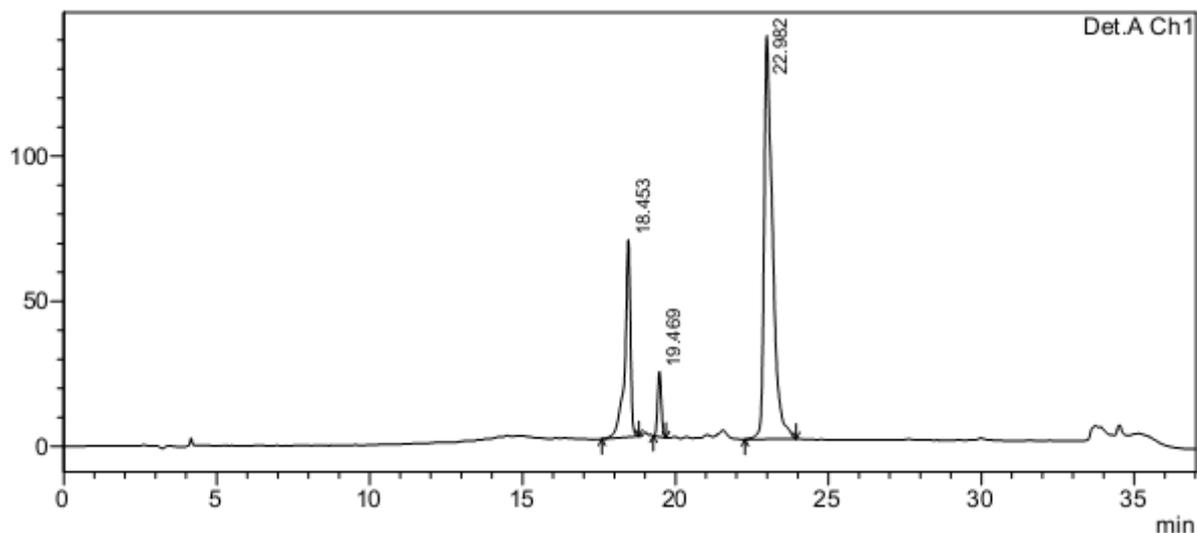


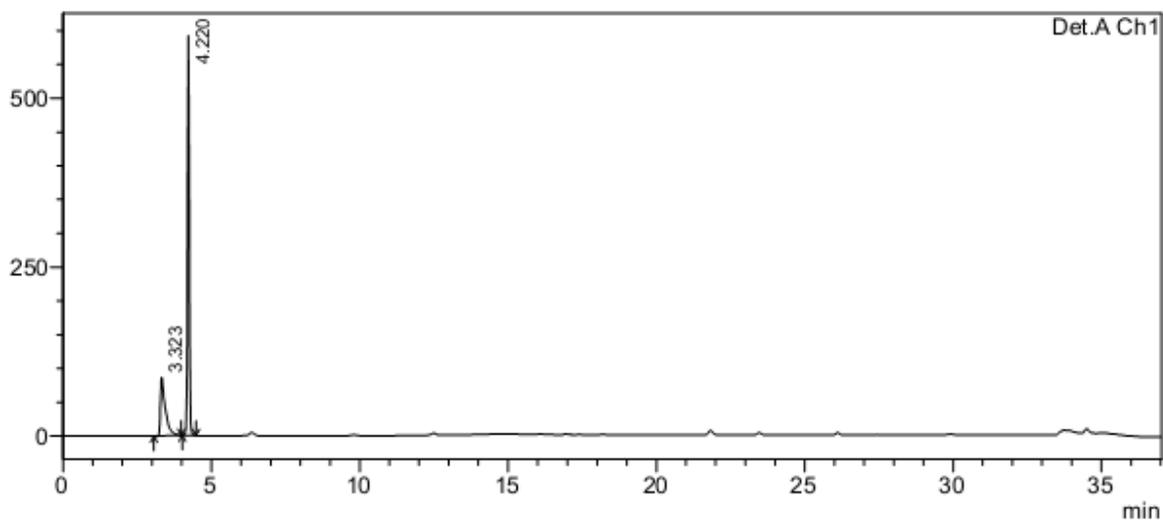
Abb. 4.03: FPLC Chromatogramm auf einer Superdex75-Säule von $\text{dT}_{18}\text{-3'Sulfo-SMCC}$ nach 2h Reaktion. Aufgrund des geringeren Molekulargewichts des Hydrolyseproduktes im Vergleich zu $\text{dT}_{18}\text{-3'SSMCC}$ und der daraus resultierenden längeren Retentionszeit konnte eine gute Trennleistung erzielt werden. Die Fraktionen A12-B1 sowie B9-B11 wurden gesammelt und durch RP-HPLC kontrolliert.



Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	18.453	872375	67982	23.304	29.628
2	19.469	190067	22473	5.077	9.794
3	22.982	2680941	138997	71.618	60.578
Total		3743383	229452	100.000	100.000

Abb. 4.04: HPLC Fraktion A12-B1 (5-30 % ACN, Methode A) Hydrolyseprodukt wurde abgetrennt und die Ausbeute an dT_{18_SSMCC} betrug rund 72%. Das $dT_{18_3'SSMCC}$ erscheint bei einer Retentionszeit von ~23 Minuten.



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.323	975889	86444	28.069	12.752
2	4.220	2500824	591441	71.931	87.248
Total		3476714	677885	100.000	100.000

Abb. 4.05: HPLC Fraktion B9-B11 (5-30 % ACN, Methode A) In dieser Fraktion findet sich das erfolgreich abgetrennte Hydrolyseprodukt.

4.1.3. Reaktion dT₁₈-3'SSMCC mit EC4-Cystein

Mittels NanoDrop wurde die spezifische Absorption bei 260 nm gemessen, daraus die Oligonukleotid-Konzentration der Fraktion A12-B1 bestimmt und mit EC4-Cys umgesetzt.

Dafür wurde dT₁₈-3'SSMCC mit EC4-Cys und 10x PBS-Puffer (pH 7,25; Endkonzentration = 5x PBS) vermennt und unter Argonatmosphäre über Nacht inkubiert. Die Menge an Oligonukleotide mit SMCC-Linker wurde aus den Peakflächen des HPLC-Chromatogramms berechnet. Das Verhältnis von Oligonukleotid (mit Linker) zu Protein betrug in der Reaktion zirka 1,1:1. Es wurde also ein 10%iger Überschuss an Oligonukleotid verwendet, um möglichst das gesamte Protein umzusetzen.

Nach 16,5 h sowie 23 h wurde eine HPLC angefertigt.

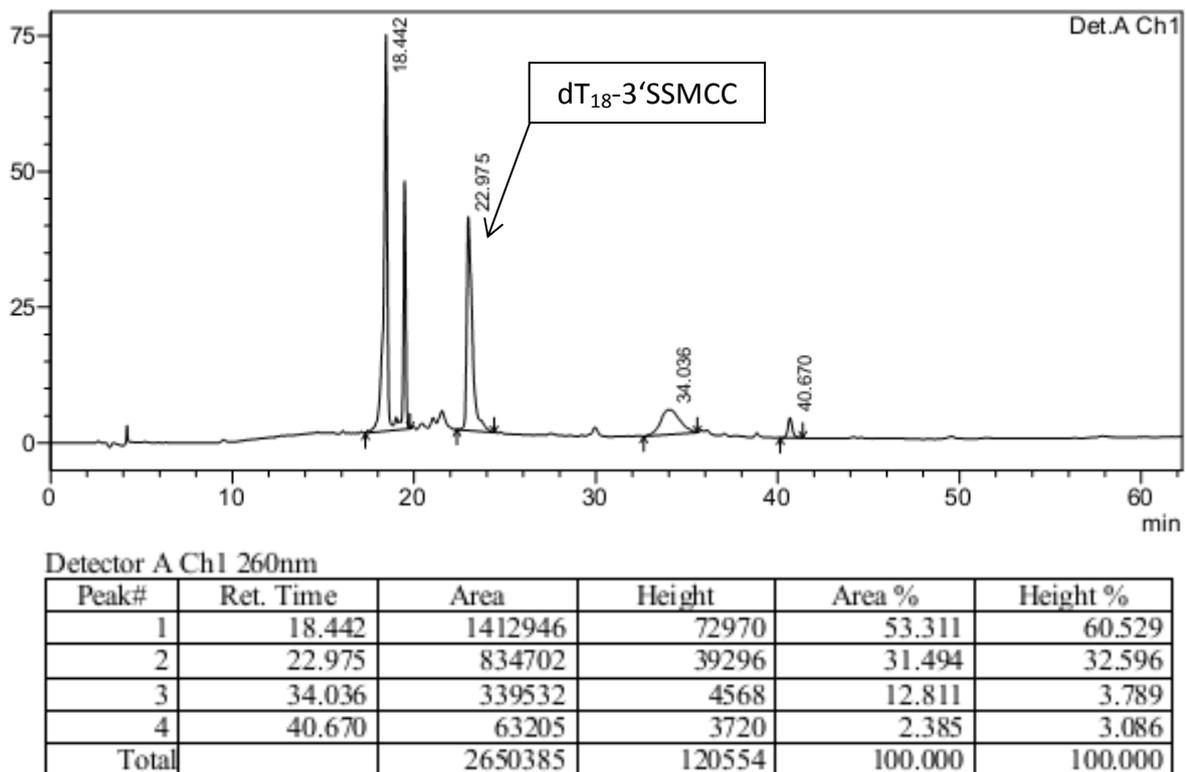


Abb 4.06: HPLC EC4_SSMCC_dT₁₈ nach 23h (5-60%, Methode B)

Das fertige EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugat ist in der HPLC nicht nachweisbar. Jedoch kann man sehen, dass dT₁₈-3'SSMCC zum überwiegenden Teil (von 72% auf 30%) abreagiert hat.

Zur weiteren Kontrolle wurde ein Oligo- und ein Proteingel angefertigt.

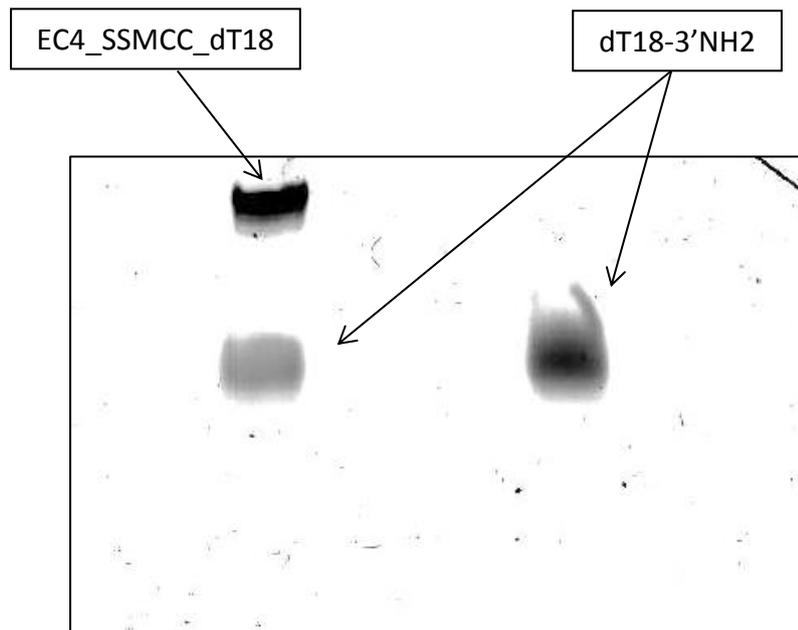


Abb 4.07: Oligogel EC4_SSMCC_dT₁₈ Für das Oligogel wurden je 1 nmol EC4_SSMCC_dT₁₈ und 1 nmol dT₁₈-3'NH₂ mit 10 µl DNA-Loading Dye gemischt, auf 95°C erhitzt und aufgetragen.

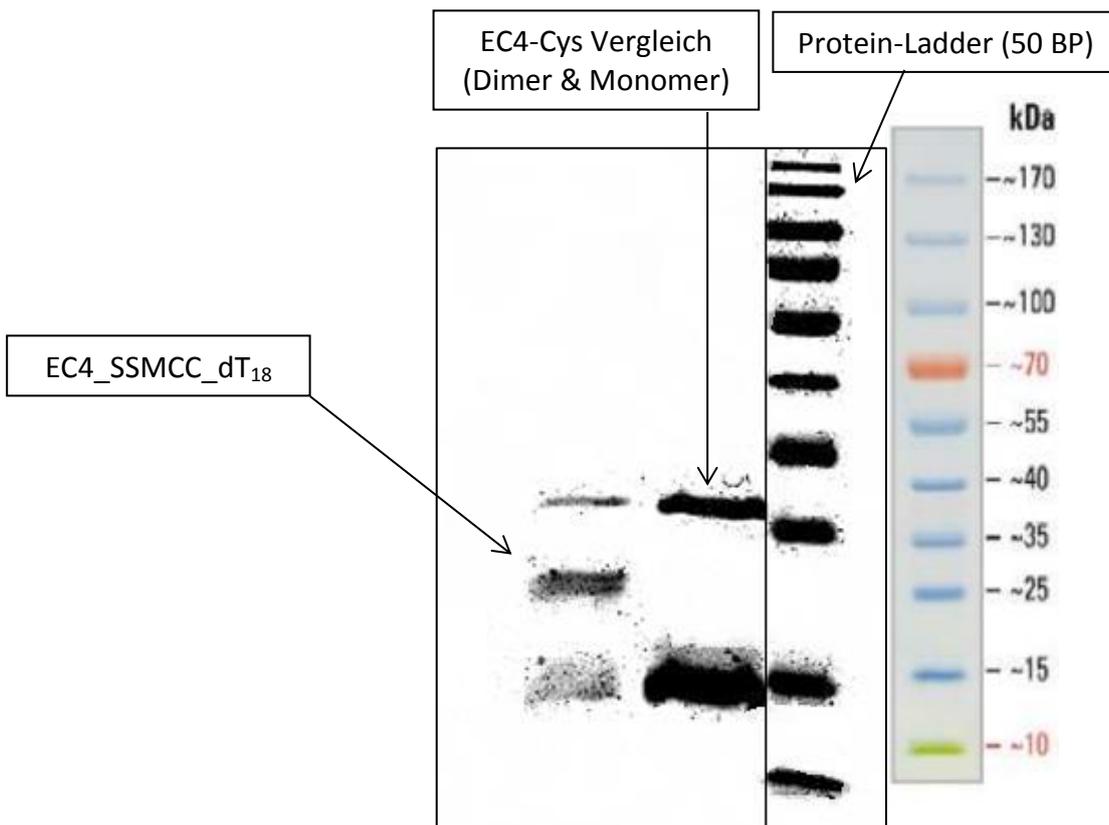


Abb 4.08: Proteingel EC4_SSMCC_dT₁₈. Die Bande bei etwa 20 kDa stellt unser Konjugat dar. Für das Proteingel wurden je 5 µg des fertigen Konjugates, 5 µg EC4-Cys und 3 µl 50 bp PageRuler Prestained Protein-Ladder verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10 µl Lämmli-Puffer gemischt und auf 95°C erhitzt.

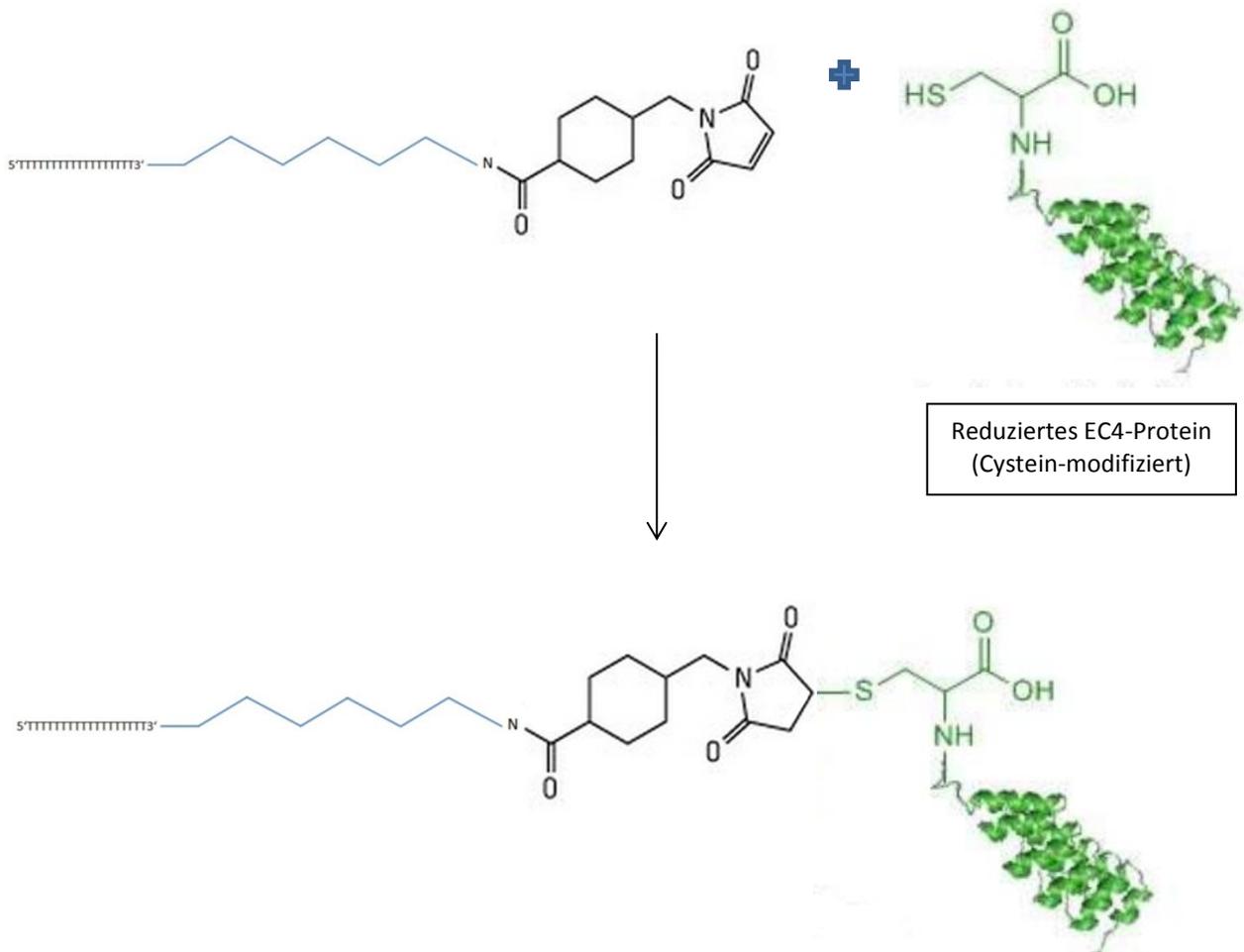


Abb. 4.09: Nach der Aufreinigung mittels FPLC Größenausschlusschromatographie wurde dT_{18} -3'SSMCC mit EC4-Cys versetzt und das DARPin über die Sulfhydryl Gruppe an das aktivierte Maleimid verknüpft. Die Ausbeute (bezogen auf EC4-Cys) liegt bei zirka 25-40%.

4.1.4. Aufreinigung des Konjugates mit Nickel-NTA

Zur Abtrennung von unreaktiertem dT₁₈ Oligonukleotid wurde der Reaktionsansatz in der Folge mit Nickel-NTA versetzt und 30 Minuten geschüttelt.

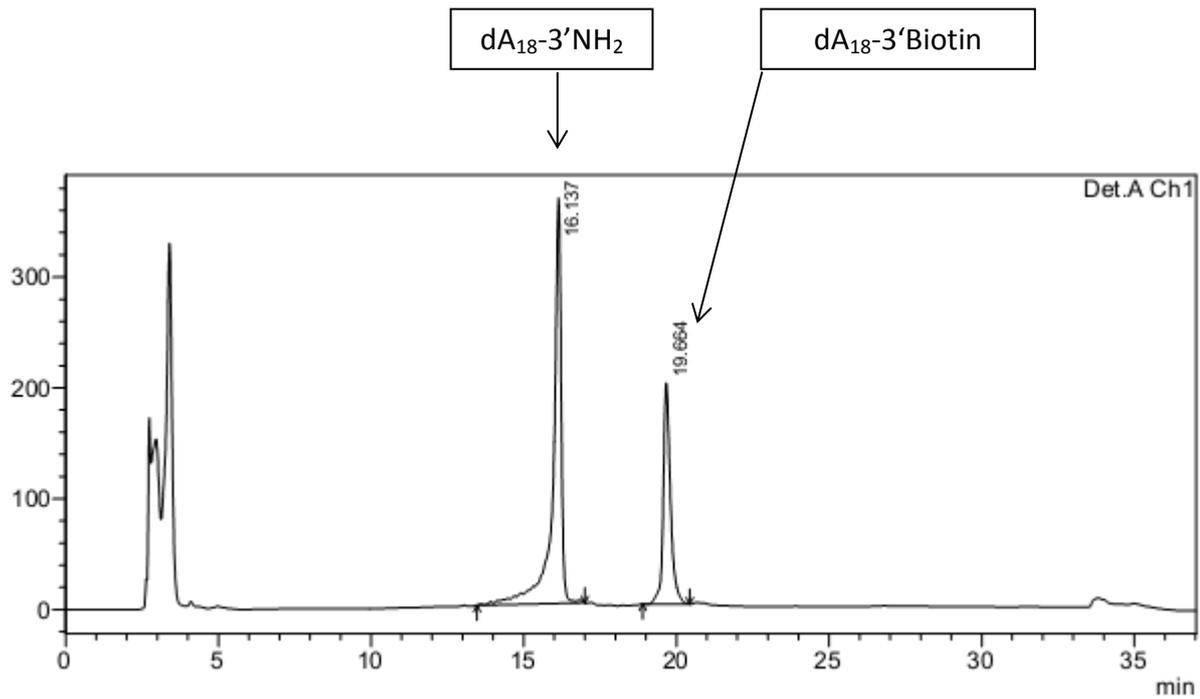
Ziel war es, überschüssiges Oligonukleotid (ohne Proteinverknüpfung) abzutrennen. Ni-NTA ist eine Affinitätschromatographische Matrix und kann His-tag modifizierte Proteine binden. Anschließend wurde die Probe in Spin-Columns überführt und mit 1x PBS gewaschen, bis am NanoDrop kein Oligonukleotid mehr nachweisbar war. Nun konnte das gereinigte Konjugat mit Imidazol eluiert werden.

Mithilfe einer Excel Tabelle und des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aufgrund der spezifischen Absorptionen bei 260 nm für Oligonukleotide und 280 nm für Proteine näherungsweise die Menge an EC4_SSMCC_dT₁₈ bestimmt werden. Die Ausbeute nach diesem Schritt betrug rund 2 nmol.

4.1.5. Endaufreinigung mittels komplementärer - biotinylierter DNA

Um unreaktiertes Protein abtrennen zu können, wurde eine DNA-basierte Affinitätschromatographie verwendet. Dazu wurde ein biotinyliertes dA₁₈ Oligonukleotid hergestellt.

Frisch zubereitetes NHS-Biotin wurde in 50-fachem Überschuss (1000 nmol) zu 20 nmol dA₁₈-3'NH₂ pipettiert und mit 10 x PBS Puffer gemischt (finale Konzentration = 5x PBS). Nach 2 Stunden am Schüttler wurde die Reaktion beendet und mittels HPLC analysiert.



PeakTable

Detector A Ch1 260nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	16.137	6799820	365577	67.335	64.715
2	19.664	3298667	199329	32.665	35.285
Total		10098486	564906	100.000	100.000

Abb. 4.11: HPLC - Biotinyliertes dA₁₈ (5-30%ACN, Methode A)
 20 nmol dA₁₈ wurde mit 50-fachem Überschuss von NHS-Biotin versetzt und in PBS-Puffer gemischt. Die Ausbeute betrug rund 33%.

Nun konnte das Konjugat auf die Sepharose-Streptavidin-Biotin-dA₁₈ Säule aufgetragen werden und mittels Duplexbildung zwischen dA₁₈ und dT₁₈ von überschüssigem Protein gereinigt werden.

Nach dem Umpuffern der Probe auf 500 mM NaCl Lösung wurde auf die gewaschene Säule aufgetragen und 15 Minuten inkubiert. Anschließend konnte der Überschuss EC4-Cys mit 500 mM NaCl abgewaschen werden. Da bei Raumtemperatur das Konjugat nicht eluiert werden konnte, wurde auf 60°C erhitzt und die Säule mit 50 mM NaCl gespült.

Die Reinheit des fertig aufgereinigten Konjugats wurde auf einem Proteingel kontrolliert sowie für spätere Zellversuche verwendet.

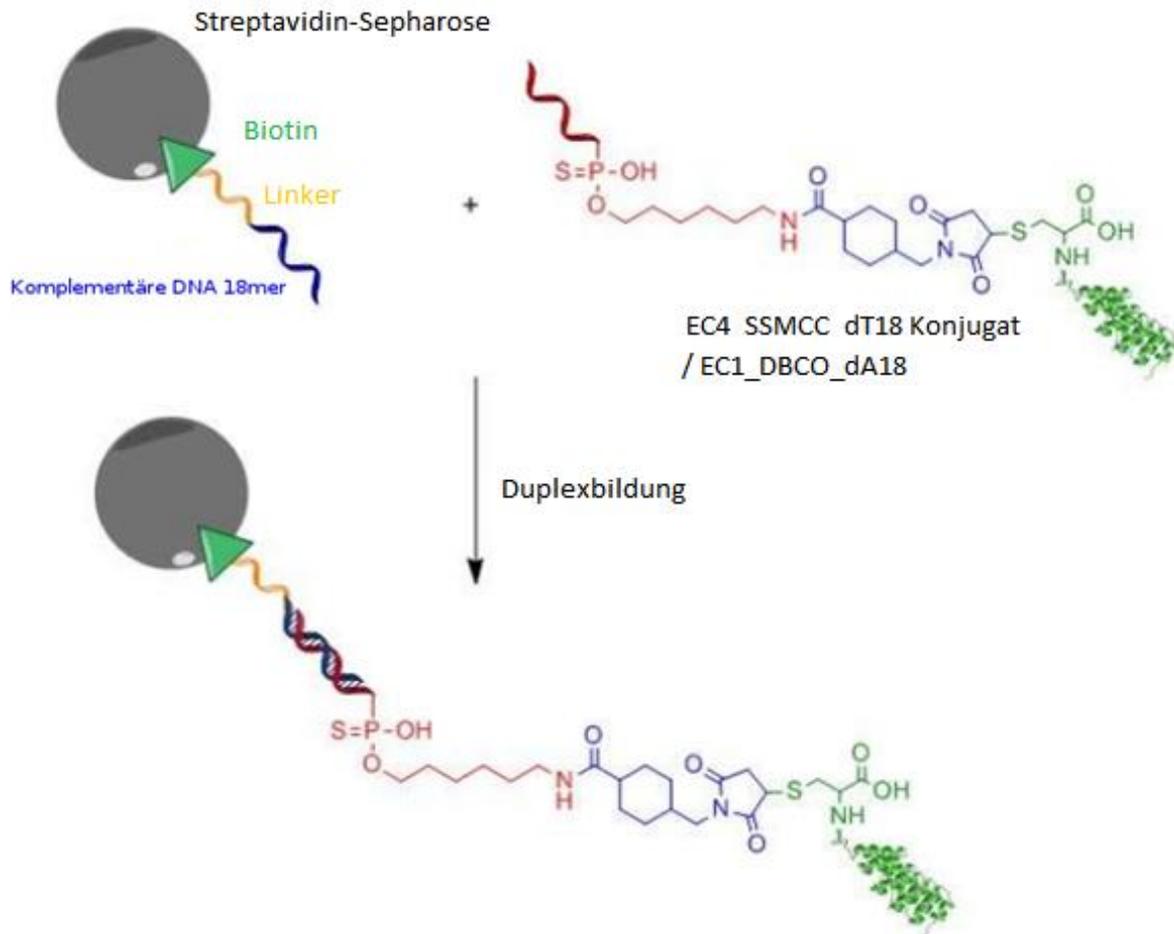


Abb 4.12: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie. An Streptavidin-Sepharose wird komplementäre, biotinylierte DNA gebunden. Über Duplexbildung bleibt EC4_SSMCC_dT₁₈ (bzw. EC1_DBCO_dA₁₈) an der stationären Phase haften und unreaktiertes Protein kann abgetrennt werden. Mittels Wärmezufuhr und sinkender Salzkonzentration lässt sich die Duplexbildung aufbrechen und die Probe kann eluiert werden.⁴⁰

4.1.6. Konjugationsreaktion über „Click-Chemie“

Für die Click-Chemie-Reaktionen wurde ein DBCO-modifiziertes Oligonukleotid verwendet. EC1-DARPin besitzt anstelle Methionins als N-terminale Aminosäure Azido-Homoalanin und kann dadurch mit Dibenzylcyclooctin-dA₁₈ über eine Alkin-Azid Reaktion einen Triazolring ausbilden.

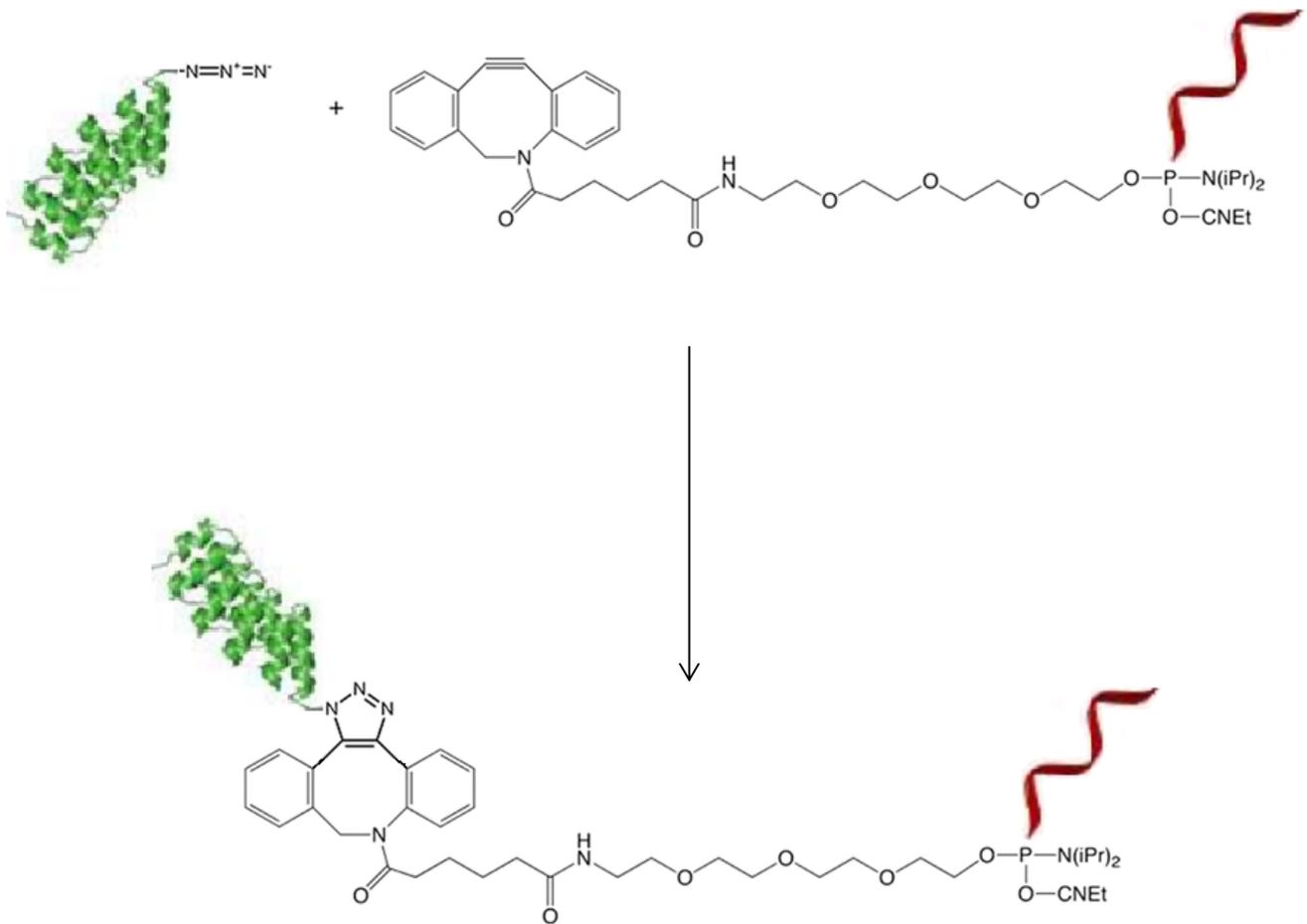


Abb 4.14: EC1 besitzt als N-Terminale Aminosäure Azido-Homoalanin und konjugiert mit DBCO-dA₁₈ über eine Alkin-Azid Reaktion (Click-Chemie) unter Bildung eines Triazolrings.

Laut HPLC war das kommerzielle Produkt DBCO_dA₁₈ lediglich zu etwa 45 % rein und mit beträchtlichen Mengen Hydrolyseprodukt verunreinigt. Das musste bei der Reaktion miteinbezogen werden. Nach 22 Stunden wurde eine RP-HPLC zur Verlaufskontrolle der Reaktion durchgeführt.

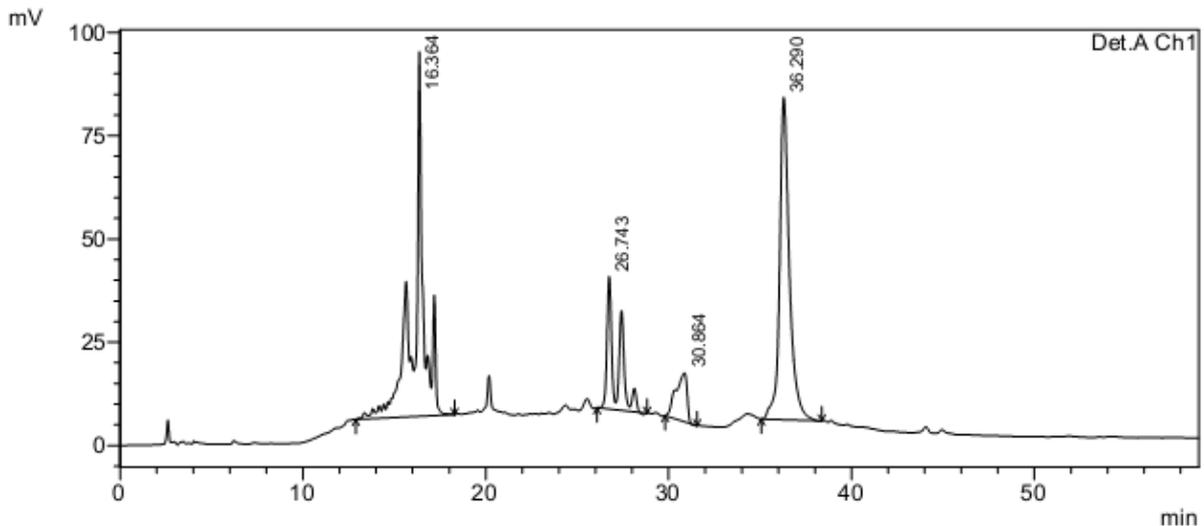


Abb 4.15: HPLC EC1_DBCO_dA₁₈ (5-60 %, Methode B) nach 22 Stunden Reaktionszeit. Der Peak bei Minute 36 war EC1_DBCO_dA₁₈ und betrug rund 40%.

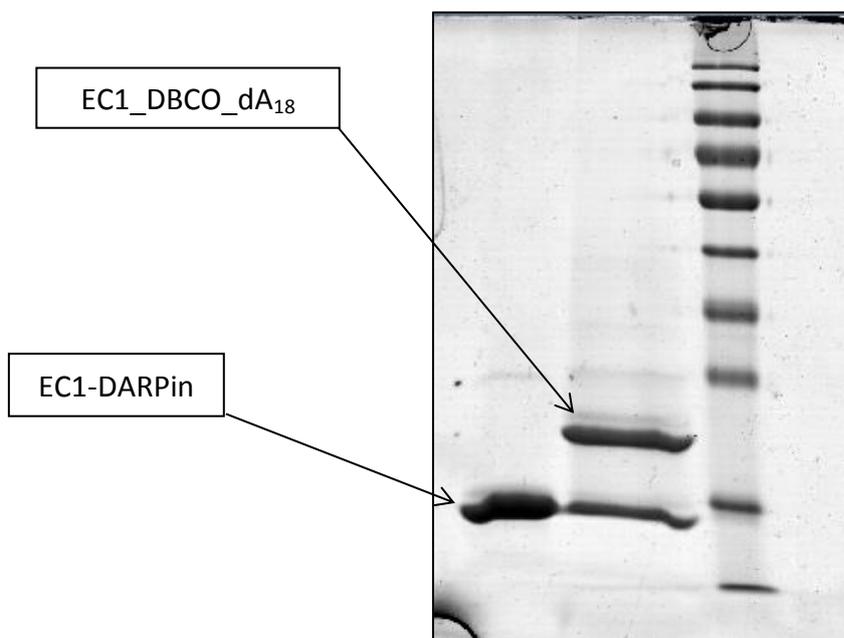


Abb 4.16: Ein Proteingel nach 22 Stunden diente zur Kontrolle der Konjugation. Neben EC1-DARPin wurde auch das DBCO-Konjugat aufgetragen. Die Intensität der Bande lässt auf eine Ausbeute von zirka 50-60% (bezogen auf Protein) schließen.

Die weitere Aufreinigung zum Endprodukt erfolgte gleich wie die des Sulfo-SMCC Konjugats, über Ni-NTA und oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie. Die Analysen bewiesen die praktisch vollständige Entfernung der unreaktierten Ausgangsprodukte.

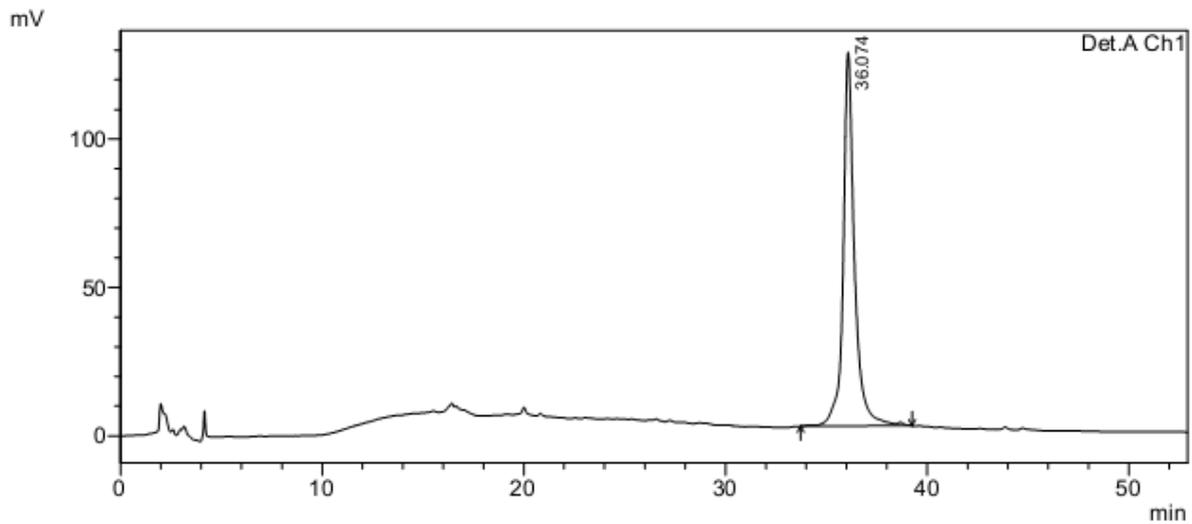


Abb. 4.17: Die erfolgreiche Abtrennung der unreaktierten Ausgangsprodukte wurde mittels RP-HPLC kontrolliert.

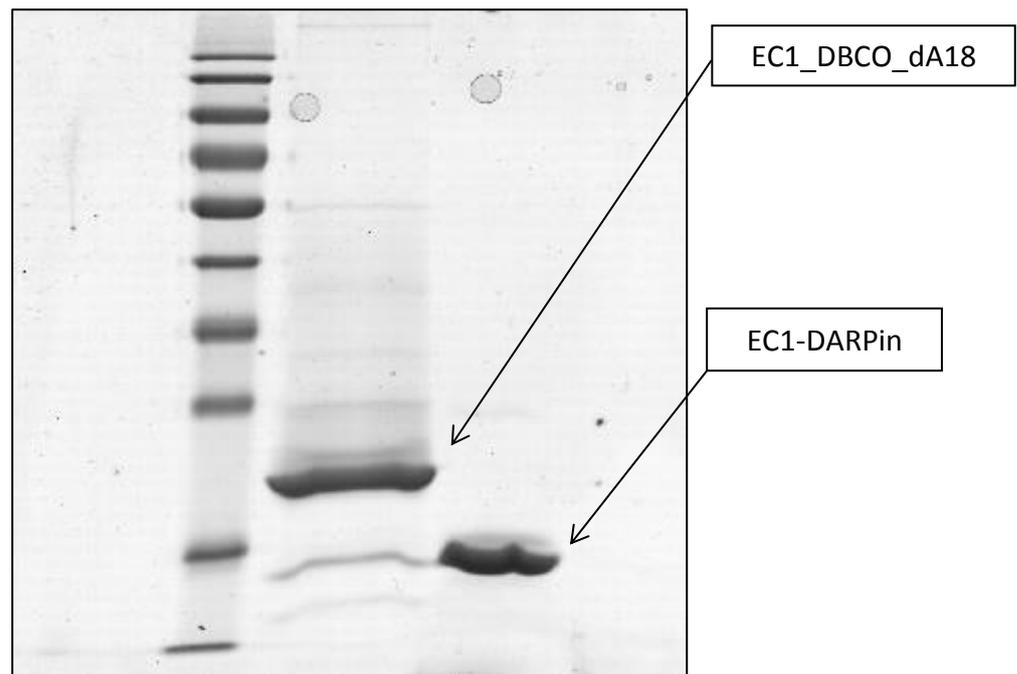


Abb 4.18: Fertig aufgereinigtes EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugat. Über Ni-NTA wurde unreaktiertes Oligonukleotid abgetrennt, über eine oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie überschüssiges EC1-DARPin. Die einzelne Bande für das Konjugat beweist die praktisch vollständige Entfernung der unreaktierten Ausgangsprodukte. Die Endausbeute nach allen Aufreinigungsschritten sowie diversen Polyacrylamidgelen betrug rund 2 nmol. (10%)

4.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität

4.2.1. Konjugation mit sticky-siRNA und DNA-Tiles

Um das Verhältnis von DARPin-Protein zu Oligonukleotid zu erhöhen, wurden DNA-Tiles (4-Arm Spacer, eine Verzweigung aus vier DNA-Oligonukleotiden mit jeweils unterschiedlichen 15-meren Überhängen) und sticky-siRNA synthetisiert. Diese wurden sowohl mit dem EC4- als auch mit dem EC1 Konjugat getestet.

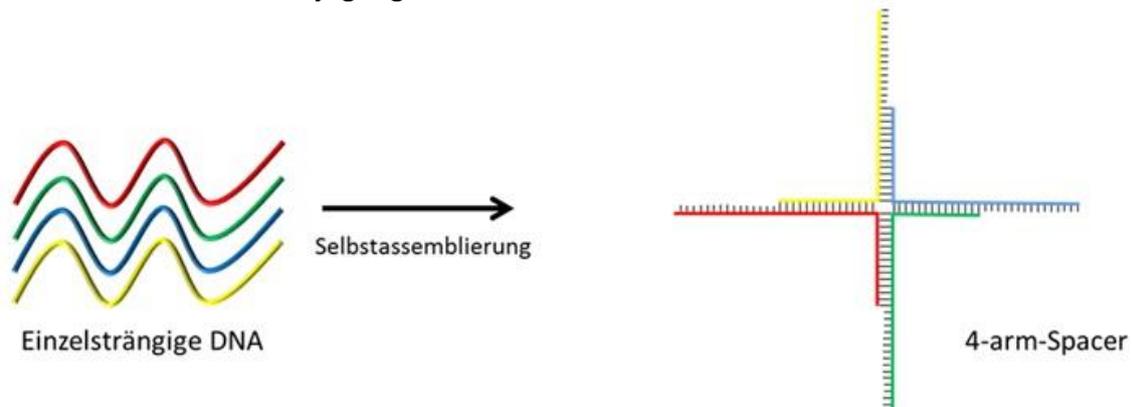


Abb 4.19: Vier separate DNA-Stränge wurden am Computer so ausgewählt, dass sie durch Selbstassemblierung einen 4-Arm-Spacer bilden.³⁹ An eine der vier freien Bindungsstellen wurde das Konjugat gekoppelt, die anderen drei standen für siRNA zur Verfügung.

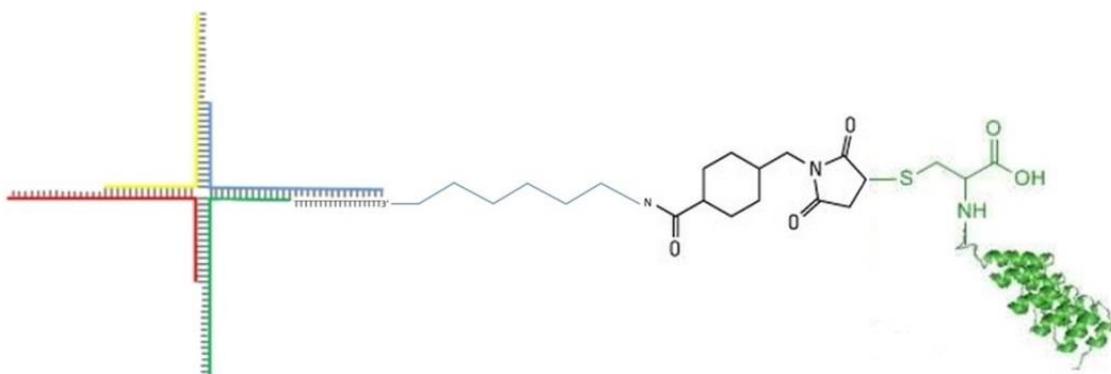


Abb. 4.20: Schematische Darstellung des fertigen EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugates, über eine dT₁₈/dA₁₈ Duplexbindung an den 4-Arm-Spacer gebunden. Jedes Protein kann nun mit drei siRNAs beladen werden.

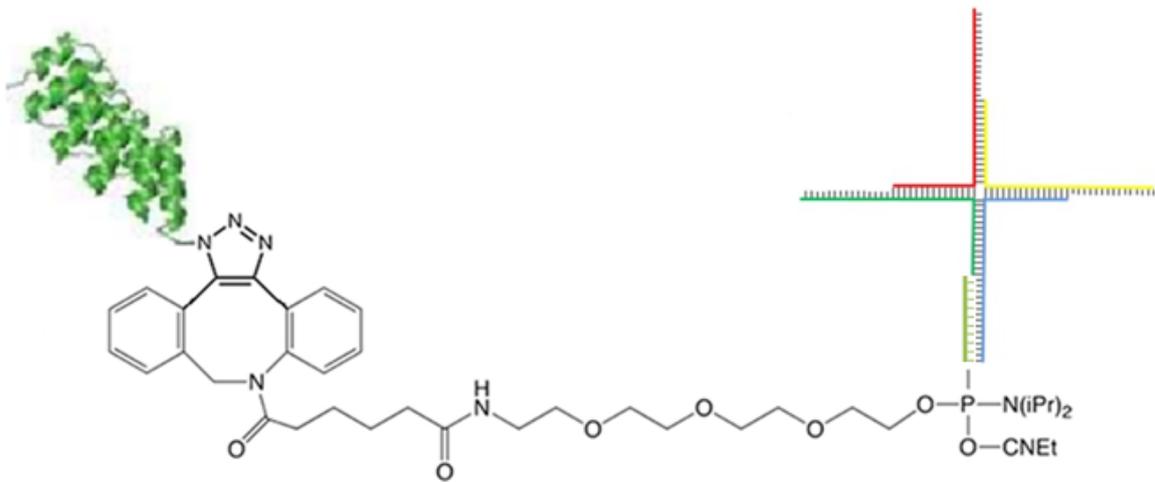


Abb. 4.21: EC1_DBCO_dA₁₈-Konjugat an den 4-Arm-Spacer gekoppelt

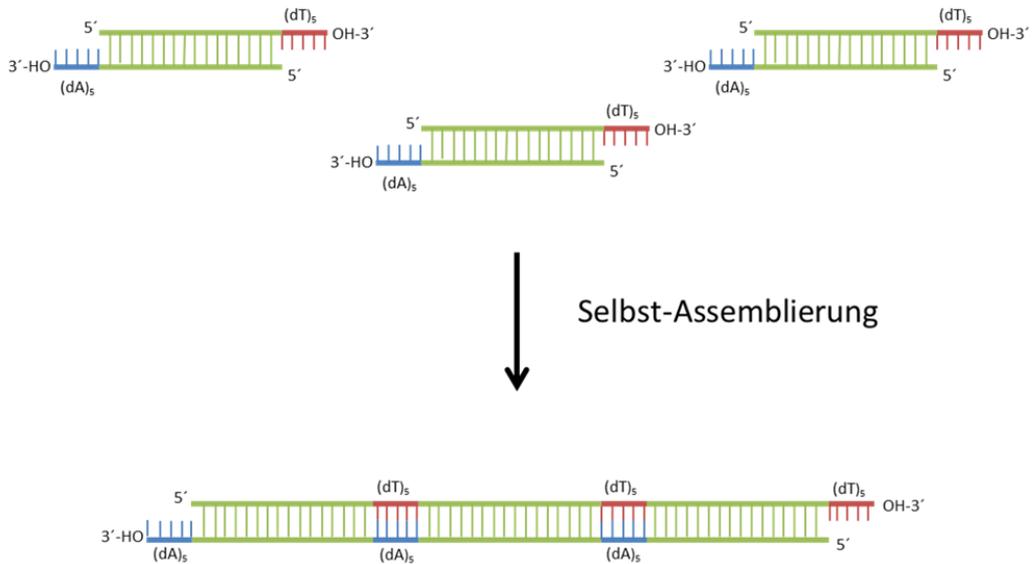


Abb. 4.22: Die Sticky-siRNA wurde so entwickelt, dass sich durch Selbst-Assemblierung ein langer „Gene-Like-DNA-Strang“ bildete. Auf diese Weise konnte die Beladungskapazität ebenfalls erhöht werden.³⁹

Die Duplexbildung erfolgte bei Raumtemperatur und wurde mittels Agarose- und nativer Oligogele kontrolliert.

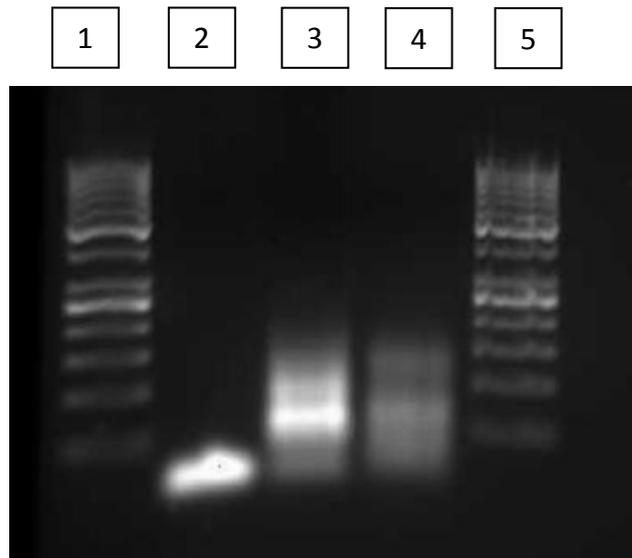


Abb 4.23: Mithilfe eines Agarosegels wurde die Duplexbildung kontrolliert. Aufgetragen wurden jeweils 100 pmol:

- 1) GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder
- 2) Luciferase-siRNA duplex
- 3) sticky-siRNA duplex
- 4) EC4_SSMCC_dT₁₈_sticky-siRNA duplex
- 5) 50 BP Protein Standard
- 6) EC4_SSMCC_dT₁₈

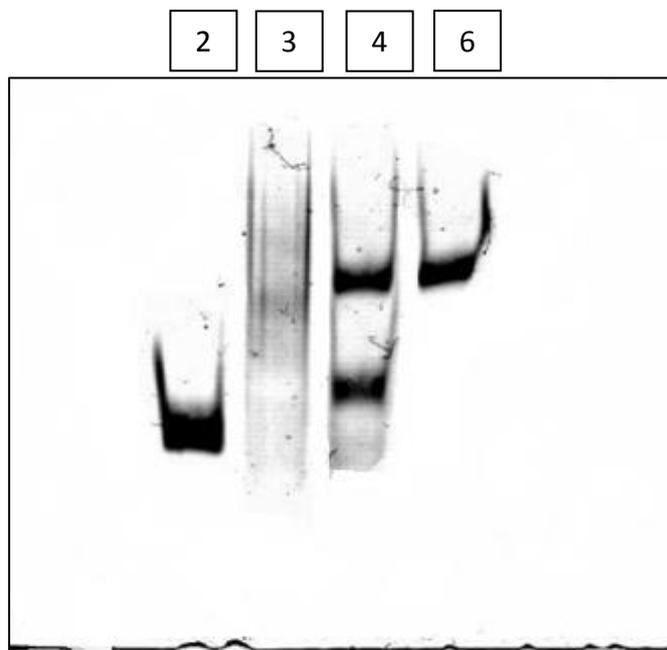


Abb. 4.24: Oligogel (nativ). Der Vergleich von EC4_SSMCC_dT₁₈_sticky-siRNA duplex mit EC4_SSMCC_dT₁₈ beweist eine Duplexierung des Konjugats mit sticky-siRNA.

4.3. Fluoreszenzmarkierung der Konjugate

Um die hergestellten Konjugate weiter untersuchen zu können, mussten sie fluoreszenzmarkiert werden. Für die sticky-siRNA wurde Alexa Fluor® 568 sowie Cy3 markiertes dA₁₈ verwendet. Für den 4-Arm-Spacer wurde ebenfalls Cy3-Farbstoff verwendet.

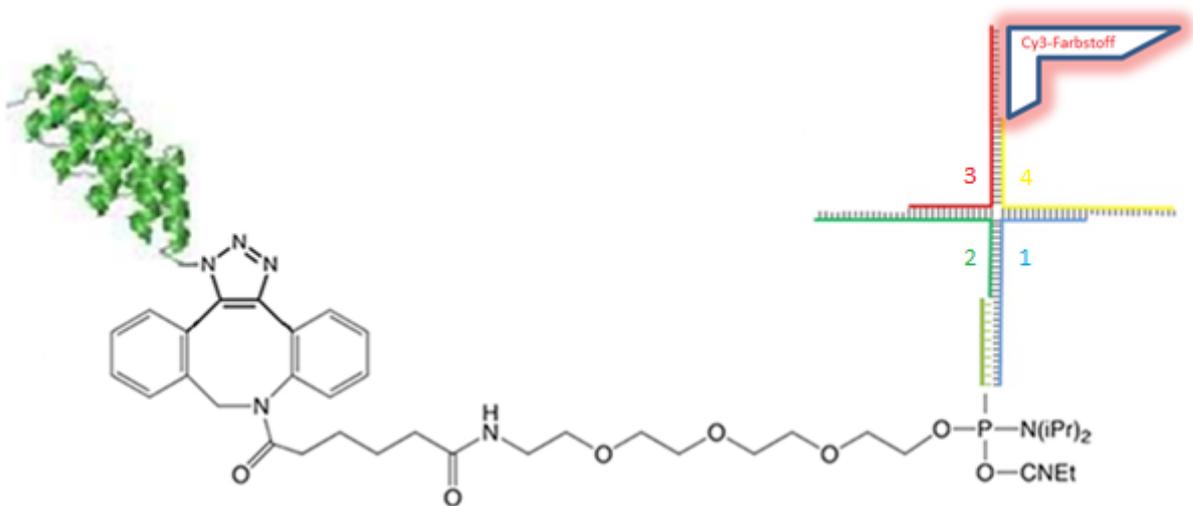


Abb. 4.25: EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugat wurde über die 18-meren dA₁₈ / dT₁₈ Überhänge an den 4-Arm-Spacer gekoppelt und mittels Cy3-Farbstoff fluoreszenzmarkiert. Cy3 war an DNA gebunden, welche zu DNA-Tile 3 komplementär synthetisiert wurde.

Die Kopplung des EC4 Konjugates an den 4-Arm-Spacer war etwas komplizierter. Es musste ein DNA „Adapter“ synthetisiert werden, welcher komplementär zu DNA-Tile 3 war und einen 18-meren dA Überhang enthielt. Auf diese Weise konnte der dA₁₈ – Cy3 Farbstoff an Tile1 knüpfen und unser EC4 Konjugat über das Zwischenstück an DNA-Tile 3.

Die einzelnen DNA-Tiles wurden in 1x PBS auf 60°C erhitzt, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluss mit Farbstoff und Konjugat versetzt.

Die Duplexbindung wurde durch native Oligogele kontrolliert:

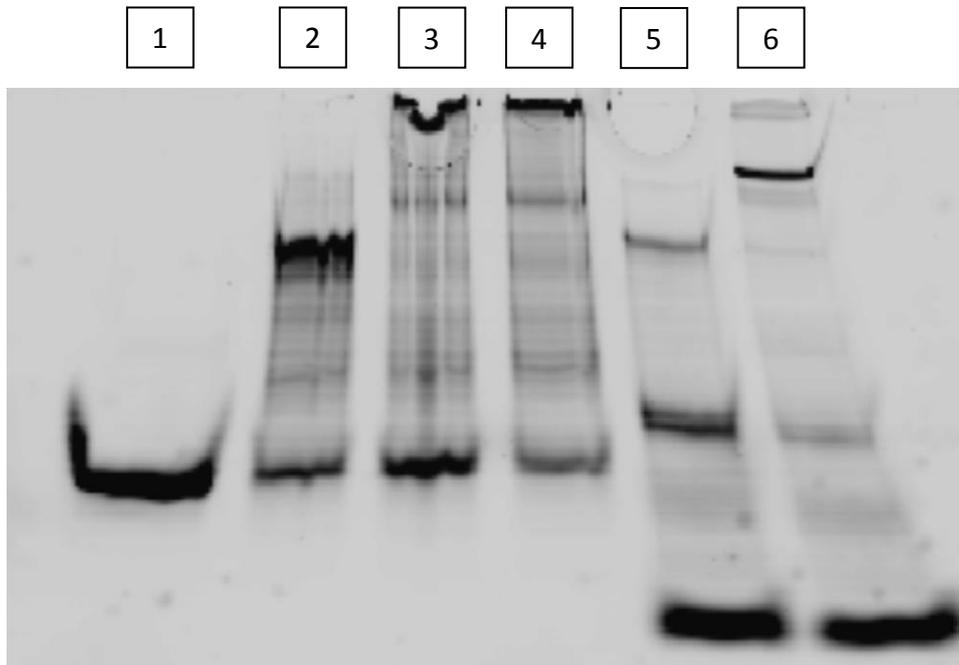


Abb. 4.26: Natives Oligogel zur Kontrolle der Duplexierung mit Konjugat und Fluoreszenzfarbstoff. Die Duplexbildung war in allen Fällen erfolgreich, allerdings war noch überschüssiger Farbstoff enthalten, was die jeweils untersten Banden erklärt.

Auftragemenge jeweils 25 pmol:

- 1) Cy3
- 2) T3+Cy3
- 3) T1-T4 + Cy3
- 4) T1-T4 + Cy3 + DBCO-Konjugat
- 5) T1+dA₁₈-Alexa
- 6) T1-T4+dA₁₈-Alexa + „Zwischenstück“ + SSMCC-Konjugat

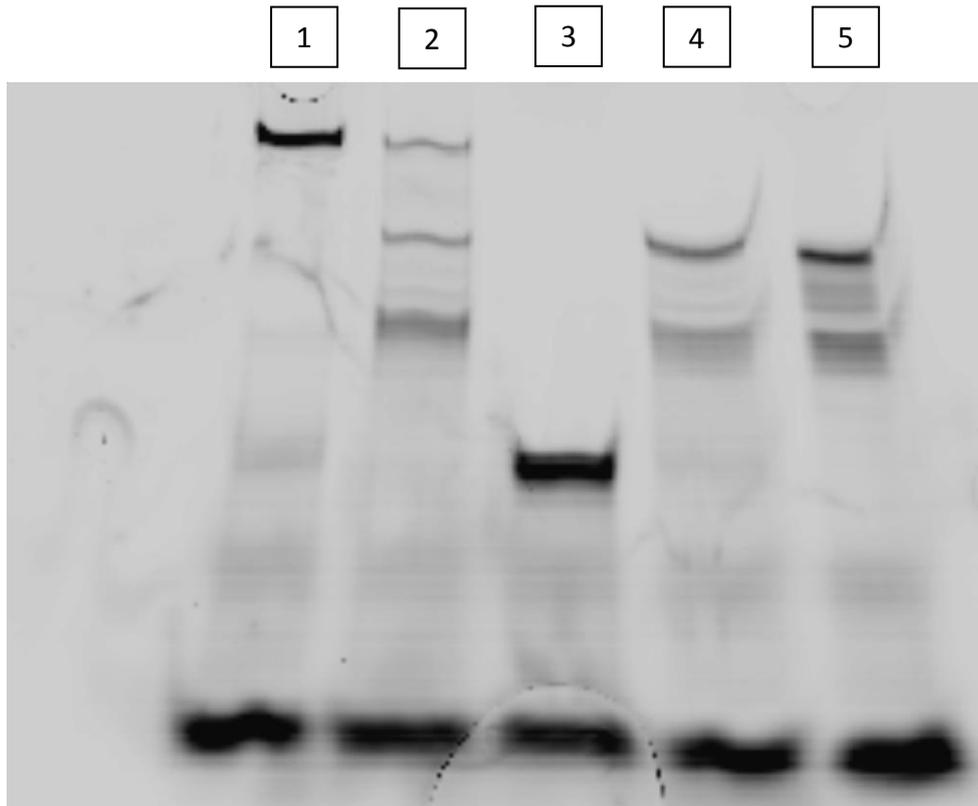


Abb. 4.27: Auf dieses native Oligogel wurden verschiedene Varianten der sticky-siRNA aufgetragen. Neben einem äquimolaren 1+1 Ansatz von sticky-siRNA Sense (SS) und Antisense-Strang (AS) wurde auch ein 4-Facher Überschuss verwendet. Die sticky-siRNA sollte nun als langer „Gene-Like RNA-Strang“ vorliegen.

Aufgetragen wurden jeweils 25 pmol:

- 1) SSMCC-Konjugat + dA18-Alexa
- 2) SSMCC-Konjugat + 3xAS + 1x dA18-Alexa + 4xSS
- 3) dA18-Alexa
- 4) 1xSS + 1x dA18-Alexa
- 5) 3xSS + 1x dA18-Alexa

Auch hier konnte eine Duplexbildung zwischen dem Konjugat und der sticky-siRNA nachgewiesen werden. Die Selbstassemblierung der sticky-siRNA zu einer „Gene-Like RNA“ konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

4.4. Zellkulturversuche

4.4.1. Zellbindungsnachweis mittels FACS

Bei erfolgreicher Bindung der Konjugate an eine Zelle ändert sich ihre Fluoreszenz im entsprechenden Wellenlängenbereich abhängig vom Farbstoff. Dies kann mithilfe eines Durchflusszytometers (Fluorescence Activated Cell Sorters, FACS) nachgewiesen werden.

4.4.1.1. EC4-Konjugat mit sticky-siRNA und 4-Arm-Spacer

EC4 + ssiRNA (Antikörper)

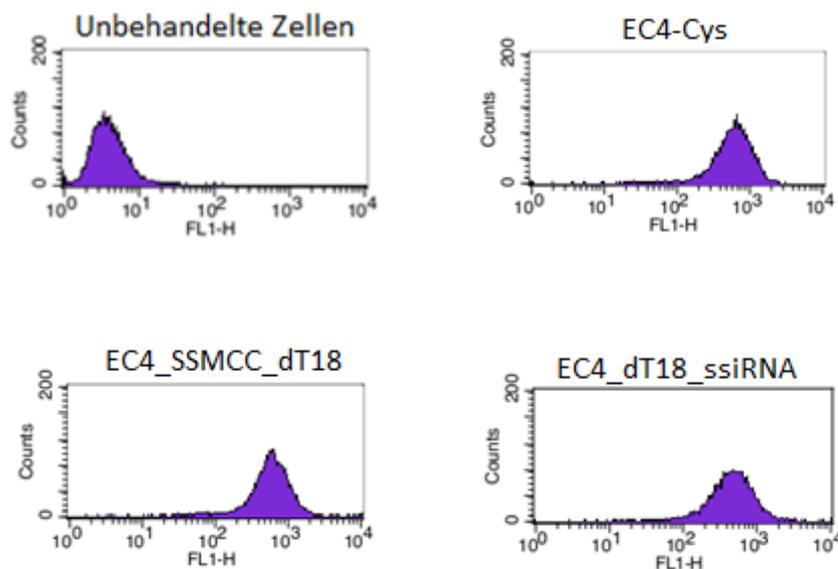


Abb. 4.28: EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugat wurde mit ssiRNA verknüpft und mittels Penta-His-Tag Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden nach einer Stunde Inkubationszeit auf Eis mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und 10 Minuten bei 4°C und 1000 RPM zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Danach wurden die Zellen in kaltem FACS-Puffer resuspendiert und Penta-His-Tag Antikörper zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde auf Eis wurden die Proben erneut zweimal gewaschen und kaltem FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen auf Eis bis zur Messung gelagert. Die gleichmäßige Zellbindung konnte eindeutig nachgewiesen werden, da der Fluoreszenzpeak deutlich verschoben ist.

Die Verschiebung des Geo Mean nach rechts (siehe Abb. 4.28) beweist die Zellbindung der Konjugate. Durch die Assoziation des Antikörpers an den His-Tag des Proteins kann die Bindung der Proteinkomponente eindeutig nachgewiesen werden.

EC4 + 4-Arm-Spacer (Antikörper)

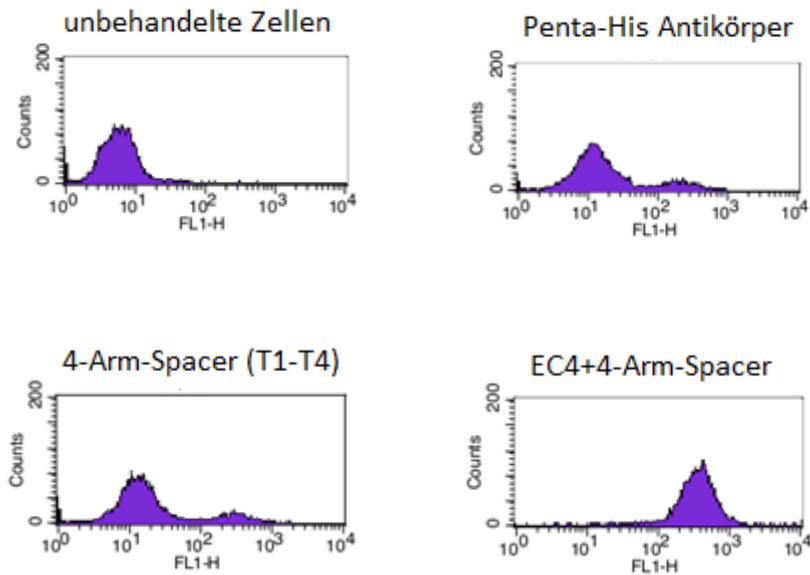


Abb. 4.29: Das EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugat wurde mit dem 4-Arm-Spacer konjugiert, nach einer Stunde Inkubationszeit auf Eis gewaschen und mit Penta-His-Tag Antikörper fluoreszenzmarkiert. (Siehe Abb. 4.28) Auch hier ist eine deutliche Verschiebung des Geo-Mean nach rechts nachweisbar, was auf eine erfolgreiche Bindung der Proteinkomponente hinweist.

Das EC4 Konjugat wurde an den 4-Arm-Spacer geknüpft und mit Penta-His-Tag Antikörper markiert. Die stärkere Verschiebung des Geo-Mean nach rechts bei der Probe mit EC4-Konjugat + 4-Arm-Spacer im Vergleich zu den Proben ohne EC4-DARPin ist in Abb. 4.29 deutlich erkennbar, was auf eine Zellbindung hinweist.

4.4.1.2. EC1-Konjugat mit sticky-siRNA und 4-Arm-Spacer

EC1+ssiRNA (fluoreszenzmarkiert)

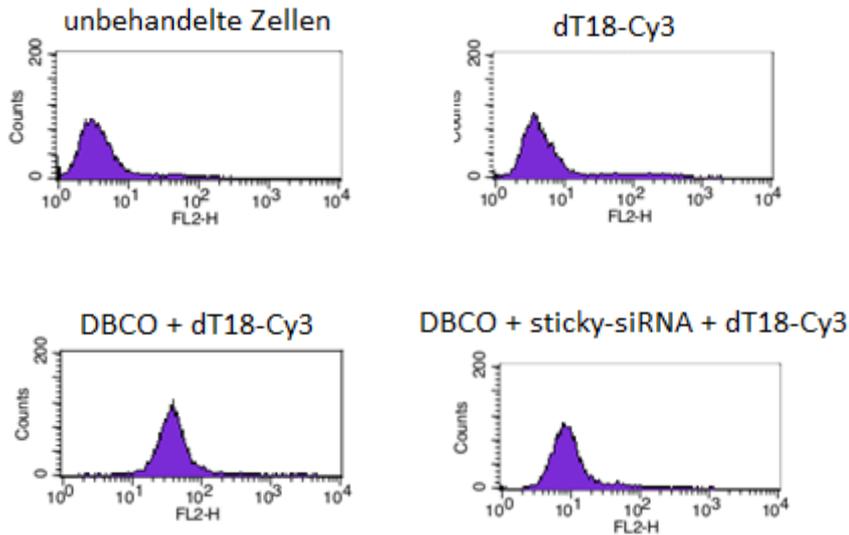


Abb. 4.30: EC1_DBCO_dA₁₈ wurde mit sticky-siRNA verknüpft, fluoreszenzmarkiert und auf die Zellsuspension aufgebracht. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurde mit kaltem FACS-Puffer zweimal gewaschen. Anschließend wurde die Probe in FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid bindet nicht an die Zellen, aber gemeinsam mit dem Konjugat resultiert eine eindeutige Assoziation mit den Zellen.

Wie in Abb. 4.30 zu sehen ist, lieferte dT₁₈-Cy3 markiertes EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugat eine Verschiebung des Geo-Mean nach rechts, welche in Kombination mit sticky-siRNA leicht abnahm. Mithilfe dieses Versuchs konnte bewiesen werden, dass das gesamte fluoreszenzmarkierte Konjugat (sowohl mit sticky-siRNA, als auch ohne) an die Zellen bindet.

EC1+4 Arm Spacer (fluoreszenzmarkiert)

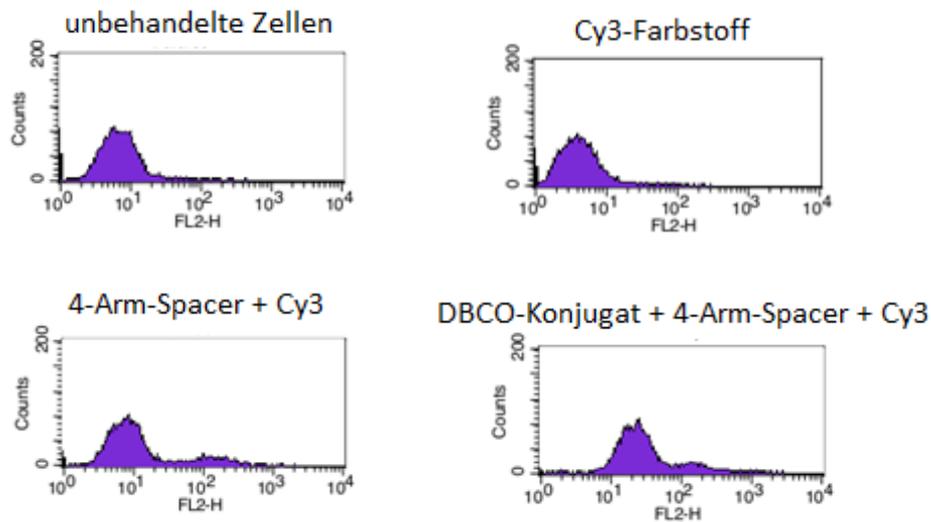


Abb. 4.31: EC1_DBCO_dA₁₈ wurde an den 4-Arm-Spacer geknüpft, mit Cy3-Fluoreszenzfarbstoff versetzt und auf die Zellsuspension aufgebracht. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und vermessen. (Siehe Abb. 4.30)

Das Produkt aus Cy3-Farbstoff, 4-Arm-Spacer und EC1_DBCO_dA₁₈ führte zu einer Verschiebung des Geo-Mean nach rechts, was auf eine erfolgreiche Konjugation und Zellbindung hinweist. Fluoreszenzfarbstoff alleine (auch in Komplex mit dem 4-Arm-Spacer) wies keine Zellbindungsaktivität auf.

Zur besseren Übersicht folgt auf den nächsten beiden Seiten die graphische Darstellung der Geo-Mean-Werte.

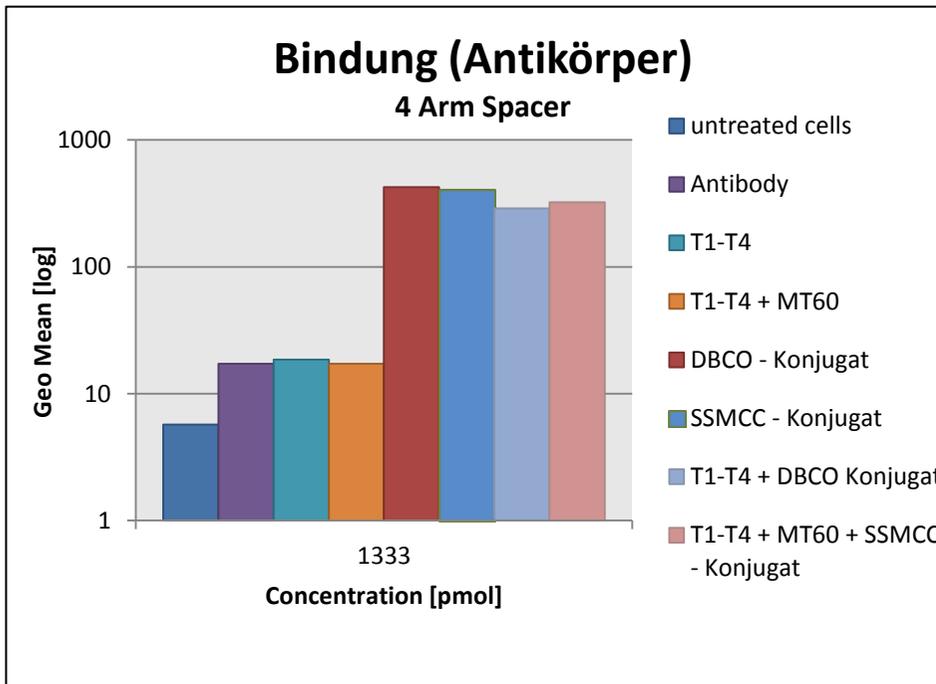
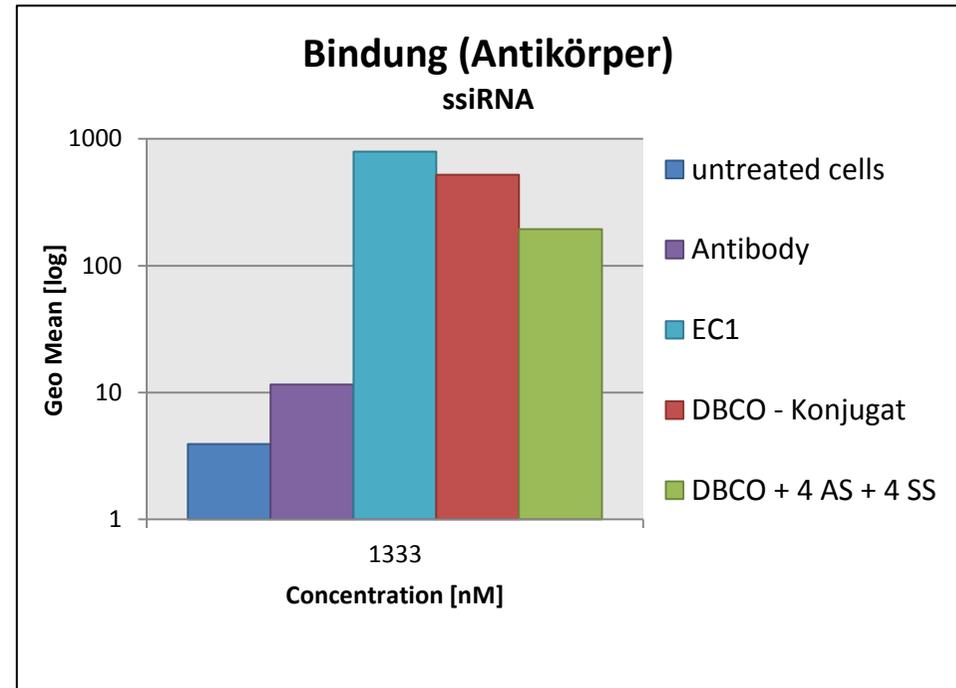
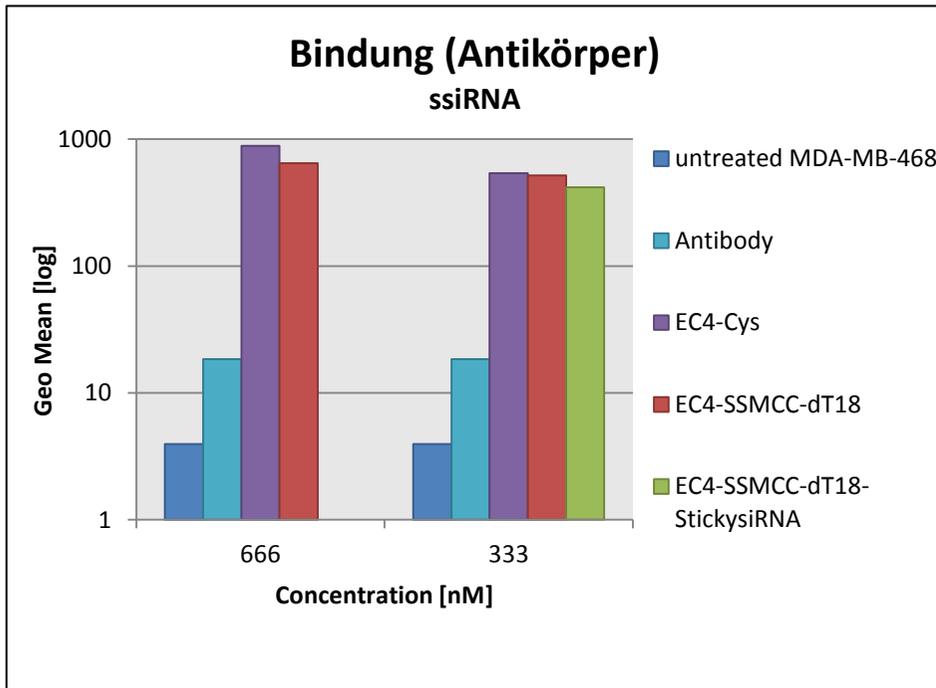


Abb. 4.32: Geo-Mean Werte der EC4 und EC1- Konjugate jeweils in Kombination mit sticky-siRNA als auch mit 4-Arm-Spacer. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte hier mit Penta-His Alexa Fluor 488 Conjugate™ Antikörper. Durch die Assoziation des Antikörpers an den His-Tag des Proteins kann die Bindung der Proteinkomponente eindeutig nachgewiesen werden. Sowohl bei dem 4-Arm-Spacer, als auch bei der sticky-siRNA verringerte sich die Zellbindung im Vergleich zu DARPIn ohne Konjugat nur sehr gering.

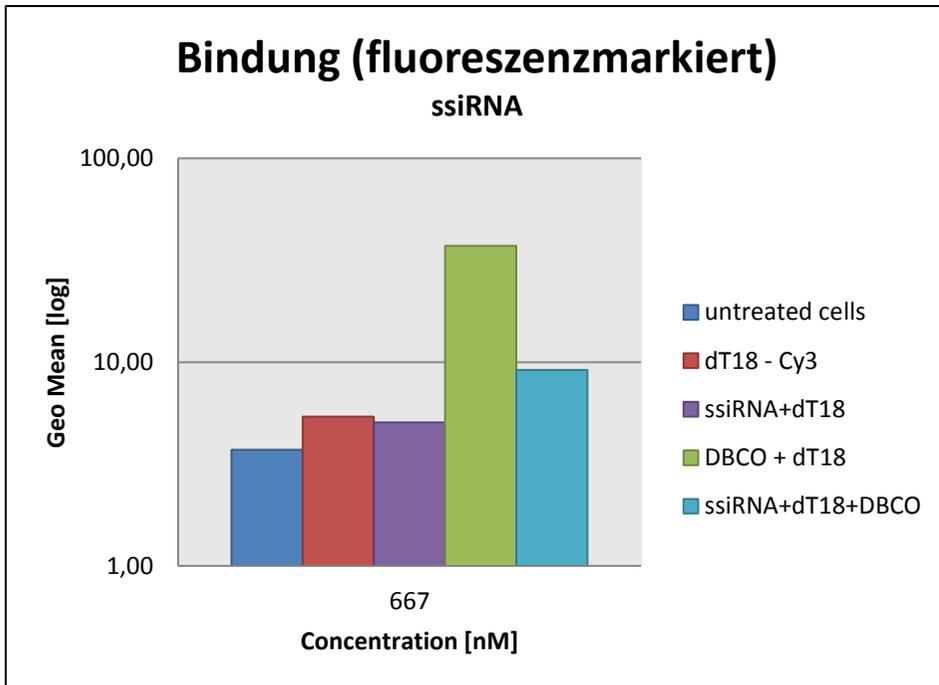
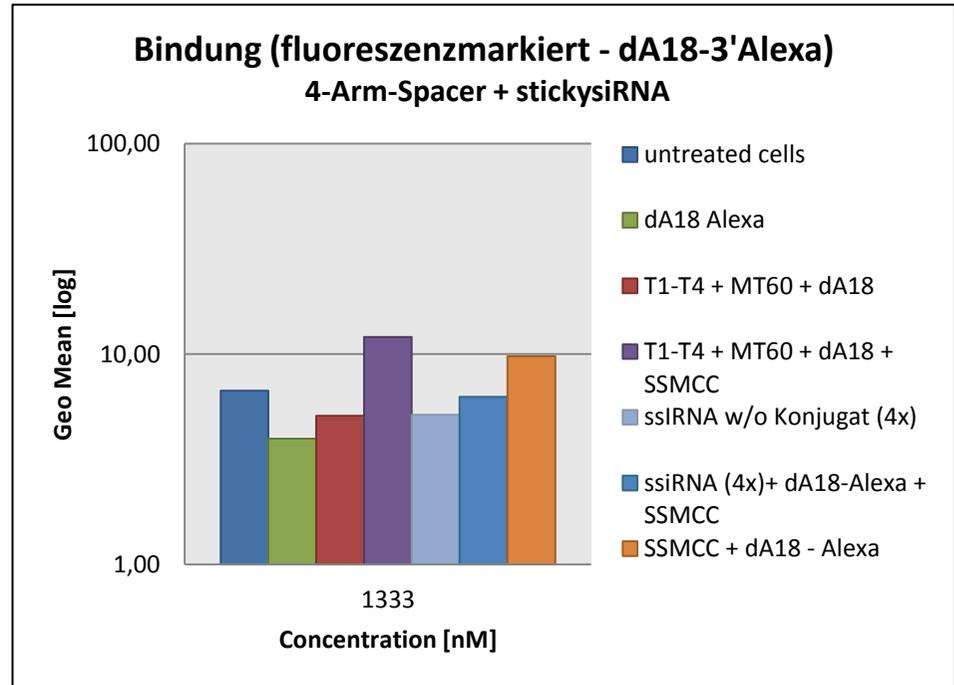
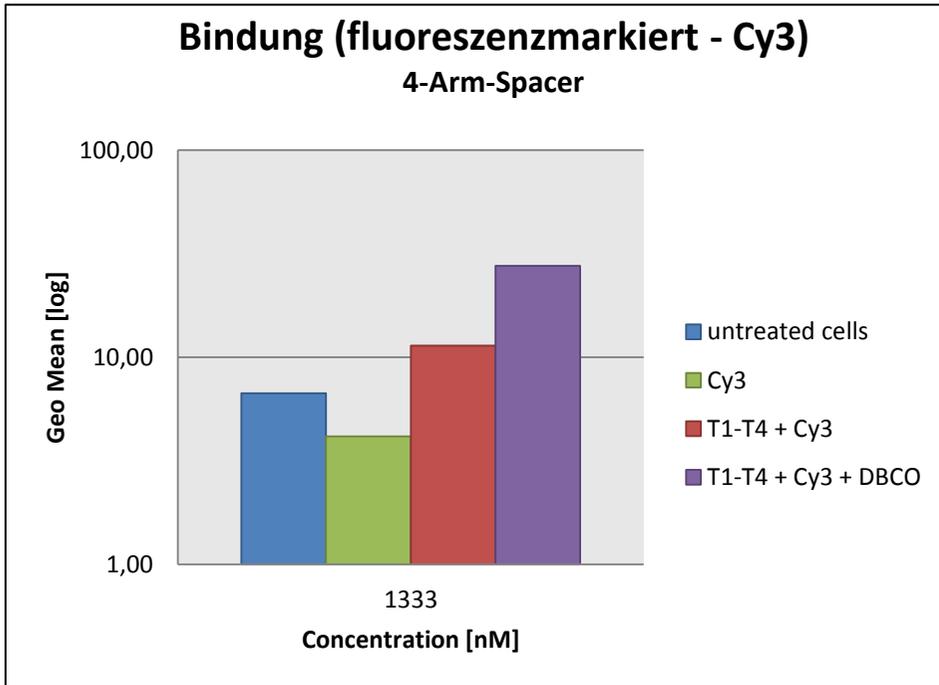


Abb. 4.33: Geo-Mean Werte der EC4 und EC1-konjugate jeweils in Kombination mit sticky-siRNA als auch mit 4-Arm-Spacer. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mithilfe fluoreszierender Oligonukleotide, welche an die Linker geknüpft wurden. Bei allen Konjugaten war die Zellbindung erhöht, lediglich bei dem mit dA₁₈-3' Alexa-Fluor 568 markierten EC4_SSMCC_dT₁₈_sticky-siRNA Konjugat war die Zellbindung leicht erniedrigt. Mithilfe der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide wurde getestet, ob das gesamte Konstrukt aus Konjugat, Linker und fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid an die Zellen bindet, was ebenfalls gezeigt werden konnte.

4.4.2. Zellaufnahme mittels FACS

Nicht nur die Zellbindung, auch die Zellaufnahme konnte mittels FACS-Versuch nachgewiesen werden. Sowohl der 4-Arm-Spacer alleine, als auch die Kombination mit DBCO Konjugat führte zu einer starken Rechtsverschiebung des Geo-Mean, also einer Assoziation des Farbstoffes mit den Zellen. Da auch das Konstrukt mit dem Cy3-markierten Oligonukleotid eine starke Erhöhung der Zellfluoreszenz ergab, scheint die Lipophilie von Cy3 für die Zellassoziation maßgeblich zu sein. Ein Einfluss der selektiven Bindung durch EC1 konnte daher nicht gemessen werden.

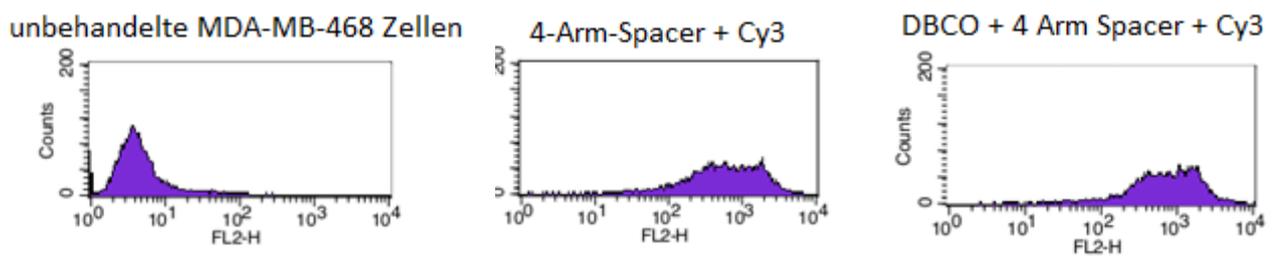


Abb. 4.32: Geo-Mean-Werte des EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugats in Kombination mit dem 4-Arm-Spacer und Cy3 Farbstoff. Für diesen Versuch wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Proben 48 Stunden bei 37° inkubiert, trypsinisiert, gewaschen und am FACS analysiert. (Siehe 3.5.3.3.)

4.4.3. Luciferase-Assay

Mit diesem Test wurde die Herunterregulation des Luciferase-Gens in stabil mit pEGFP-Luc Plasmid transfizierten SW480 Zellen kontrolliert. Durch die Kombination mit einem Bradford-Assay wurden die Ergebnisse auf die vorhandene Proteinmenge korrigiert. So konnten Schwankungen durch unterschiedliche Zellzahlen in den einzelnen Wells vermieden werden.

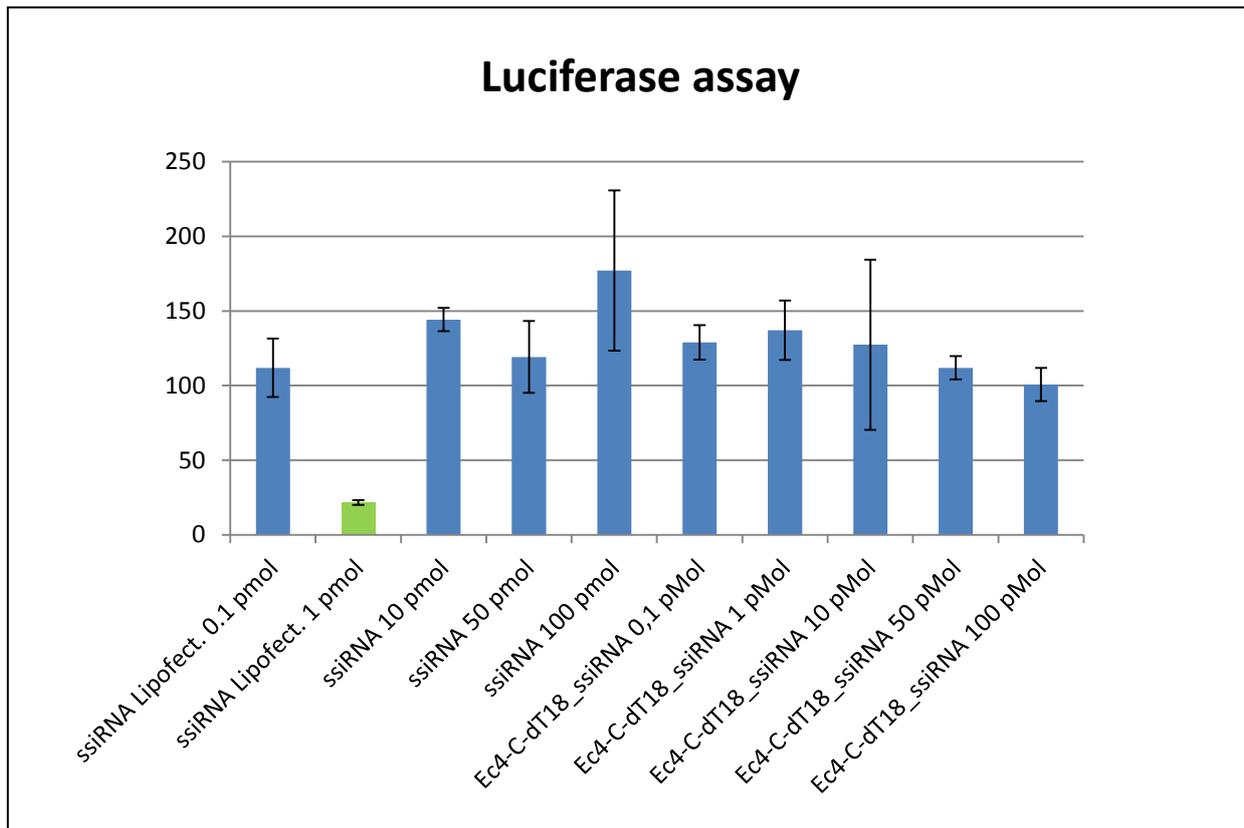


Abb. 4.32: Der Luciferase-Assay in SW480 Zellen wurde mit EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugat durchgeführt, welches mit sticky-siRNA verknüpft wurde. Die ssiRNA bestand aus Anti-Luciferase siRNA und war in einer Konzentration von 1 pmol in Kombination mit Lipofectamin in der Lage, die Lumineszenz zu mindern. Alle Werte wurden mittels Bradford-Assay auf die vorhandenen Proteinmengen normalisiert. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wird mittels Student-t-test bestimmt. Der signifikant reduzierte Wert ist grün markiert.

Die Herunterregulation des Luciferase-Gens funktionierte nur mit sticky-siRNA (1 pmol) in Kombination mit Lipofectamin-Transfektionsreagens. Ohne Lipofectamin war keine Down-Regulation erkennbar. Die siRNA in Verbindung mit den Konjugaten ergab also keinen gene-silencing Effekt in diesem Zellmodell.

4.4.4. Zellaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie

Das EC1-Konjugat wurde mit dem 4 Arm Spacer verknüpft, fluoreszenzmarkiert, auf MDA-MB-468 Zellen aufgebracht und 48 Stunden inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde durch die geeignete Wellenlänge angeregt und anschließend durch einen passenden Emissionsfilter fotografiert. Durch einen Overlay mit normalbelichteten Fotos konnte die Zellaufnahme analysiert werden.

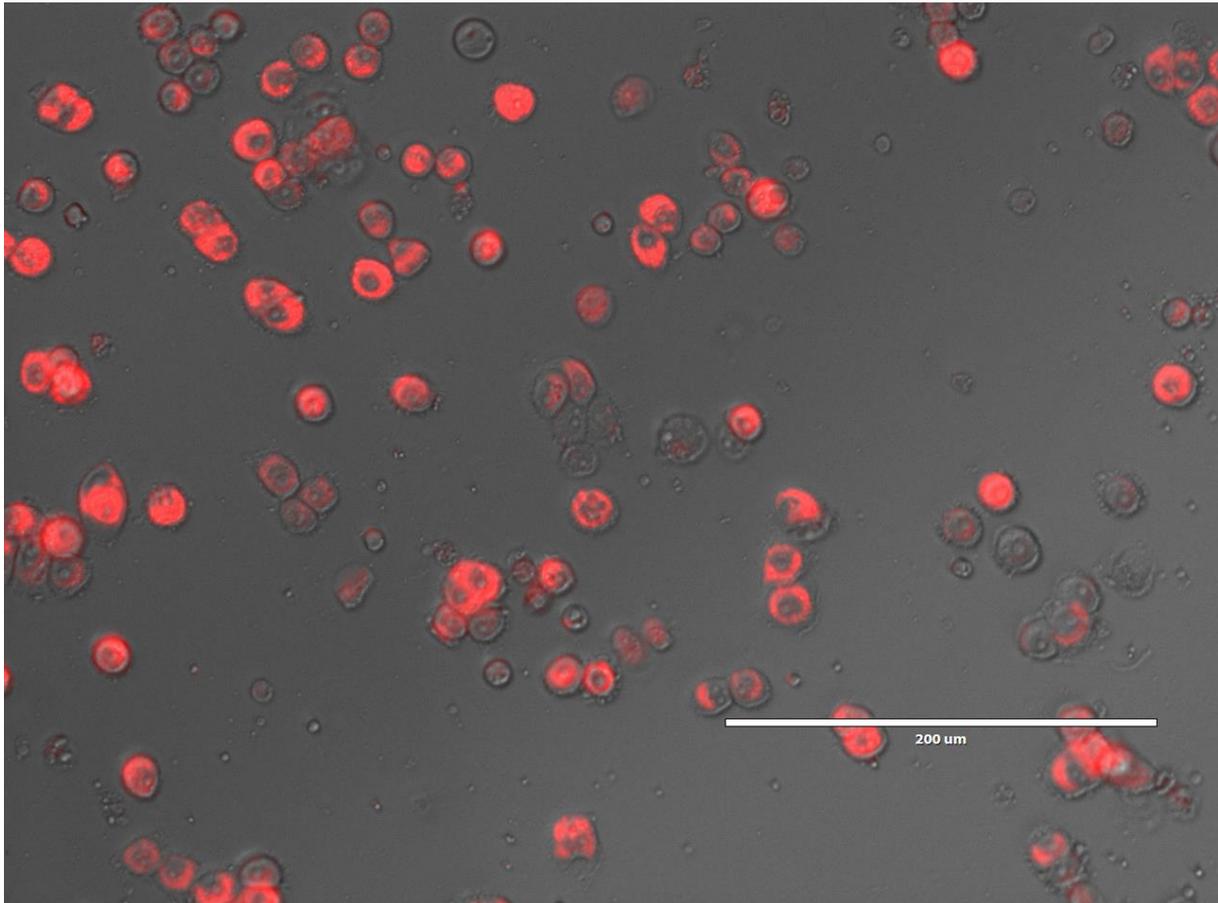


Abb. 4.32: EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugat wurde mit dem 4-Arm-Spacer verknüpft und fluoreszenzmarkiert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit auf MDA-Zellen wurden Fotos geschossen und analysiert. Die Zellaufnahme ist deutlich zu sehen.

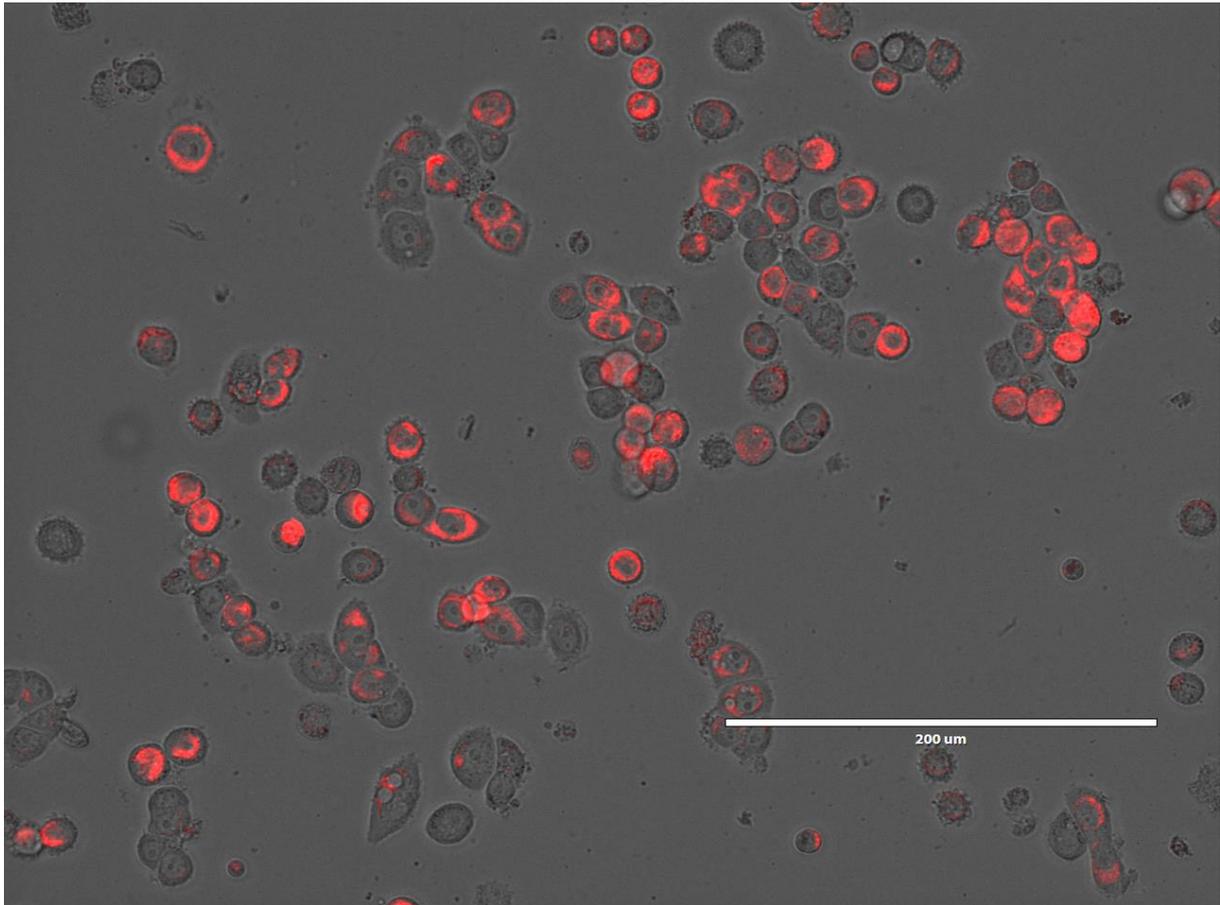


Abb. 4.33: Der fluoreszenzmarkierte 4-Arm-Spacer ohne DARPin weist ebenfalls eine starke Zellaufnahme auf. Somit kann nicht sicher eruiert werden, ob der lipophile Cy3-Farbstoff alleine für die Zellaufnahme verantwortlich ist.

Der Cy3-fluoreszenzmarkierte 4-Arm-Spacer wies sowohl in Kombination mit EC1_DBCO_dA₁₈, als auch alleine eine hohe Zellaufnahme auf. Somit konnte nicht sicher eruiert werden, ob die Lipophilie des Farbstoffes für die Internalisierung verantwortlich gemacht werden kann.

5. Diskussion

5.1. Herstellung und Aufreinigung der Konjugate

Die Entwicklung von DARPin-Verbindungen aus verschiedenen Konjugationsstrategien erwies sich als relativ unproblematisch. Der erste Reaktionsschritt bei der Herstellung des EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugats war die Verknüpfung der Aminogruppe des dT₁₈-3'NH₂ mit dem N-Hydroxysuccinimidester des Sulfo-SMCC und lieferte Ausbeuten im Bereich von ~50-75%. Als Nebenreaktion hydrolysiert der NHS-Ester im wässrigen Millieu, weswegen der große Überschuss für hohe Ausbeuten nötig ist. Außerdem stören Aminverbindungen, etwa Spuren von Ammoniak, das für die Oligonukleotid-Abspaltung verwendet wird, die Reaktion. Ein 50-facher Überschuss an Sulfo-SMCC und ein pH-Wert des PBS-Puffers von 7,7 war für eine erfolgreiche Reaktion ausschlaggebend.⁴⁰ Die anschließende Abtrennung überschüssigen Sulfo-SMCCs mittels Größenausschlusschromatographie (FPLC) funktionierte durch die unterschiedlichen Retentionszeiten der Hydrolyseprodukte und des dT₁₈-3'SSMCC einwandfrei und wurde durch RP-HPLC kontrolliert. Mit DTT wurde das dimere EC4-Cystein reduziert und weiter umgesetzt. Hierzu wurde ein 10%iger Überschuss an Oligonukleotid, sowie PBS-Puffer mit pH ~ 7,2 verwendet. Nach einer Reaktionsdauer von 24 Stunden waren etwa 2/3 des dT₁₈-3'SSMCC umgesetzt. Mittels Nickel-NTA-Agarose, einer Affinitätschromatographie für His-Tag-modifizierte Proteine, konnte überschüssiges Oligonukleotid abgetrennt werden. Für die Abtrennung von unreaktiertem DARPin musste eine oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie entwickelt werden. An Streptavidin-Sepharose wird komplementäre, biotinylierte DNA gebunden. Über Duplexbildung bleibt EC4_SSMCC_dT₁₈ (bzw. EC1_DBCO_dA₁₈) an der stationären Phase haften und unreaktiertes Protein kann abgetrennt werden. Die Duplexbindung ist abhängig von der Salzkonzentration des Puffers und der Temperatur. Entgegen den Erwartungen konnte das Produkt zunächst nicht mit niedriger Salzkonzentration bei Raumtemperatur von der Säule eluiert werden. Mittels Wärmezufuhr und sinkender Salzkonzentration lässt sich aber die Duplexbildung aufbrechen und die Probe konnte erfolgreich eluiert werden. Die Biotinylierung der homomeren dA-Oligonukleotide lieferte nur geringe Ausbeuten, weshalb im Laufe dieser Diplomarbeit auf kommerziell erhältliche biotinylierte DNA ausgewichen wurde. Die Aufreinigungsschritte führten zu einer einzelnen Bande auf den Polyacrylamidgelen, was die Reinheit des fertigen Konjugats beweist.

Für die Click-Chemie wurden mehrere Versuchsansätze getestet. Eine HPLC-Analyse des DBCO-dA₁₈ zeigte im von Microsynth gelieferten Produkt fast 50 % eines Nebenprodukts, welches praktisch eine gleiche Elutionszeit wie unmodifiziertes dA₁₈ aufwies. Dieses Hydrolyseprodukt entsteht während der kommerziellen Synthese und konnte von Microsynth durch präparative HPLC nicht abgetrennt werden. Da nach der Konjugationsreaktion ohnehin ein Aufreinigungsschritt durchgeführt werden musste, wurde entschieden, keine vorherige Isolation des DBCO-verknüpften Oligonukleotids zu unternehmen. Am effektivsten war der Ansatz mit 20 nmol DBCO und 18 nmol EC1-DARPin. Allerdings enthielt das kommerzielle DBCO-Oligo lediglich zu ~45% Produkt, wodurch sich ein finales Verhältnis von zirka 2:1 zugunsten des DARPins ergab. Auf diese Weise wurde versucht, möglichst das gesamte DBCO-Oligo reagieren zu lassen. Die Aufreinigung zum finalen Endprodukt erfolgte wieder über Ni-NTA sowie Oligonukleotidbasierte Affinitätschromatographie und wurde durch Oligo- und Proteingele kontrolliert. Nach allen Aufreinigungsschritten und diversen Polyacrylamidgelen betrug die Menge an gereinigtem EC1_DBCO_dA₁₈ rund 2 nmol. 9 nmol DBCO-Oligo waren zu Beginn vorhanden, das entspricht einer isolierten Ausbeute von rund 25%. Die Ausbeuten könnten voraussichtlich in größeren Ansätzen gesteigert werden.

Generell ist die Konjugationsreaktion über Click-Chemie komfortabler. EC1 muss nicht erst reduziert werden, das Oligonukleotid konnte bereits mit DBCO verknüpft eingesetzt werden und stand daher sofort für eine Konjugation mit Protein zur Verfügung. Die Reaktionsbedingungen hinsichtlich optimalem pH-Wert und Puffer können noch genauer analysiert werden, um die Ausbeute weiter zu erhöhen.

5.2. Methoden zur Erhöhung der Beladungskapazität

Die Synthese der sticky-siRNA sowie des 4-Arm Spacers wurde über einen Polygen Synthesizer realisiert.³⁹

Zur Selbstassemblierung des 4-Arm Spacers erwies sich folgende Methode als gut geeignet: Äquimolare Mengen der einzelnen DNA-Oligonukleotide wurden in wenig 1x PBS gemischt, einige Minuten auf 60°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Herstellung der sticky-siRNA wurde Sense-Strang und Antisense-Strang äquimolar in 1x PBS gemischt, ebenfalls auf 60°C erhitzt und langsam abgekühlt. Danach folgte die Zugabe eines fertig aufgereinigten Konjugats.

Die anschließende Duplexbildung über dA₁₈ / dT₁₈ Überhänge bei Raumtemperatur war schnell und stabil, was durch Agarose- sowie Oligogele belegt wurde.

Die Bildung eines langen „Gene-Like DNA“ Stranges der sticky-siRNA mit dem Oligonukleotid-Konjugat konnte auf einem nativen Gel nicht eindeutig nachgewiesen werden. Obwohl die errechnete Schmelztemperatur (von ~50°C) eine stabile Hybridisierung unter den Bedingungen des Gellaufs, der unter Kühlung durchgeführt wurde, erwarten lässt, wurde ein Großteil der Oligonukleotide auf der Höhe des Einzelstrang gefunden. Mögliche Erklärungen sind eine unzureichende thermodynamische Stabilität des Homo-Adenosin-Homo-Thymidin Duplexes oder eine Ausbildung einer Sekundärstruktur der Poly-A bzw. Poly-T Überhänge, die eine erfolgreiche Paarung mit dem Komplementärstrang verhinderten. Die korrekte und erwartete Hybridisierung des 4-Arm Spacers konnte hingegen eindeutig gezeigt werden.

5.3. Analytik

Die Analytik der chemischen Zwischenschritte bis hin zum fertigen Produkt mittels HPLC und verschiedener gelelektrophoretischer Methoden erwies sich als gut geeignet.

Die angewendeten HPLC Methoden verfügten über eine geeignete Trennleistung, um die verschiedenen Oligonukleotide (zum Beispiel mit Sulfo-SMCC konjugiertes dT₁₈ im Vergleich zu unreaktiertem Oligonukleotid) sauber darzustellen. Das fertig aufgereinigte EC4_SSMCC_dT₁₈ Konjugat konnte im Unterschied zu dem EC1_DBCO_dA₁₈ Konjugat nicht detektiert werden.

Durch Auswertung der Agarose-, Oligo- und Proteingele konnten die einzelnen Reaktionsschritte kontrolliert sowie die Duplexierung an die Linker zur Erhöhung der Beladungskapazität gezeigt werden. Eine Verschiebung der Bande deutete auf erfolgreiche Assoziation hin.

5.4. Fluoreszenzmarkierung der Konjugate und Zellkulturversuche

Die Fluoreszenzmarkierung der Konjugate war für die weitere Untersuchung, vor allem auf Zellkulturen, notwendig. Zu Beginn dieser Arbeit wurde Alexa Fluor® 568 Farbstoff verwendet, welcher an dA₁₈-3'NH₂ modifiziertes Oligonukleotid gekoppelt wurde.

Da die Ausbeute und Aufreinigung nicht zufriedenstellend war, wurden für die späteren Versuche Cy3-fluoreszenzmarkierte Oligos der Firma Microsynth verwendet.

Jedoch zeigten die Experimente überraschend hohe Fluoreszenzsignale nach Inkubation der Zellen mit Cy3-markierten Oligonukleotiden. Dadurch konnte keine Differenzierung zu Konstrukten mit DARPin gezeigt werden. Diese Eigenschaft von Cy3 erscheint aufgrund der lipophilen Struktur dieses Farbstoffes als durchaus realistisch. Für eindeutige Aussagen sollte daher ein anderer Farbstoff verwendet werden.

Mithilfe verschiedener Zellkulturversuche sollte neben der Bindung des Konjugates auch seine Aufnahme sowie die Fähigkeit zur Herunterregulierung des Luciferase-Gens bewiesen werden. Fluoreszenzmarkierter Penta-His-Tag Antikörper sowie fluoreszenzmarkierte Konjugate wurden verwendet, um die Zellbindung am FACS sichtbar zu machen.

Bei den Versuchen mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper konnte die Zellbindungsaffinität des DARPins an EpCAM-positive Zellen nachgewiesen werden. Mithilfe fluoreszierender Oligonukleotide wurde getestet, ob das gesamte Konstrukt aus Konjugat, Linker und fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid an die Zellen bindet, was ebenfalls gezeigt werden konnte. Es zeigte sich – bis auf eine Ausnahme – überall eine starke Verschiebung des Geo Mean nach rechts, was auf eine erfolgreiche Zellbindung hinweist. Lediglich bei dem mit dA₁₈-3' Alexa-Fluor 568 markierten EC4_SSMCC_dT₁₈_sticky-siRNA Konjugat war die Zellbindung leicht erniedrigt. Die beiden Linker (4-Arm-Spacer und sticky-siRNA) lieferten sowohl in Komplex mit EC4-, als auch mit EC1-Konjugat sehr gute Ergebnisse, und die Zellbindung wurde im Vergleich zum freien DARPin nicht signifikant abgeschwächt. Diese geringen Unterschiede könnten möglicherweise an einer gewissen sterischen Hinderung durch die Oligonukleotide liegen, welche die Bindungsaffinität des DARPins zu seinem EpCAM Rezeptor verringern könnten. Die Daten zeigen aber, dass keine signifikante Verringerung der funktionellen Bindung durch die Oligonukleotidverknüpfung resultiert.

Die Detektion mit His-tag spezifischem Antikörper lieferte dabei eindeutigere Signale als die Detektion eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids. Das liegt zum einen an der Zahl der markierten Moleküle - während mehrere sekundäre Antikörper an ein Proteinmolekül binden können, liegt lediglich maximal ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen markiertem Oligonukleotid und Konjugat vor - zum anderen ist das Fluoreszenzsignal des grünen Alexa 488 Farbstoffes im verwendeten Flow Cytometer deutlich größer als das der beiden roten Farbstoffe Alexa 568 und Cy3. Die schwache Zellbindung des EC4 Konjugats in Kombination mit sticky-siRNA könnte auch an der unzureichenden Konjugation des Alexa-Fluor Farbstoffs an das Oligonukleotid dA₁₈ liegen. Durch Einsatz der sticky siRNA ist eine

breite Verteilung unterschiedlicher langer Konstrukte zu erwarten, und auch die Bindung des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids unterliegt im Gegensatz zur DNA-Verzweigung einer heterogenen Verteilung. Eventuell war dadurch die Konzentration bzw. das Fluoreszenzsignal zu schwach, um am FACS detektiert werden zu können.

Die positive Aufnahme der Konjugate in die Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Da auch das Konstrukt mit dem Cy3-markierten Oligonukleotid eine starke Erhöhung der Zellfluoreszenz ergab, scheint die Lipophilie von Cy3 für die Zellassoziation maßgeblich zu sein. Ein Einfluss der selektiven Bindung durch EC1 kann daher nicht gemessen werden. Für die weiteren Zellaufnahmeversuche sollte auf andere Farbstoffe ausgewichen werden.

Eine Herunterregulierung des Luciferase-Gens durch sticky-siRNA konnte nicht gezeigt werden, lediglich in Kombination mit einem Transfektionsreagens. Dies ist aber für einen therapeutischen Nutzen am Menschen irrelevant, da dieses Transfektionsreagens *in vivo* toxisch wirkt. Die nicht erfolgreiche Herunterregulierung des Zielgens könnte auch durch eine unzureichende EpCAM-Expression des verwendeten Zellmodells begründet sein. Die SW480 Zelllinie weist zwar eine Expression des EpCAM-Rezeptors auf, diese ist aber verglichen mit anderen Zellen, wie z. B. MDA-MB-468 geringer.

5.5. Konklusion

Die Konjugation von Oligonukleotiden an DARPins stellt eine elegante Möglichkeit dar, die Probleme, die bei simpler Injektion von Nucleinsäuren in den menschlichen Körper auftreten, zu umgehen. DARPins können so entwickelt werden, dass sie in der Lage sind, faktisch an jedes Antigen zielgerichtet zu binden und dort einen Effekt zu verursachen.

Die Herstellung der Konjugate in dieser Diplomarbeit ist einfach und relativ schnell. Beide Möglichkeiten der Konjugation, sowohl über eine Amid-Maleimid Bindung (EC4), als auch über die Alkin-Azid Reaktion (EC1) versprachen hohe Ausbeuten von bis zu 70% (vor der Aufreinigung) und eine einfache Abtrennung unerwünschter (unreagierter) Nebenprodukte. Die finalen Ausbeuten nach allen Aufreinigungsschritten sowie nach diversen Polyacrylamidgelen zur Verlaufskontrolle, betragen rund 10-25%.

Die funktionierende Aufreinigung zum fertigen Endprodukt geschah mittels FPLC, Ni-NTA- sowie oligonukleotidbasierter Affinitätschromatographie und wurde durch Oligo- und Proteingele bewiesen.

Die anschließende Konjugation an den 4-Arm-Spacer oder die sticky-siRNA zur Erhöhung der Beladungskapazität erwies sich als unproblematisch. Auch wenn bisweilen noch Stabilitätsprobleme der ssiRNA auftreten, so liefert der 4-Arm Spacer ausgezeichnete Ergebnisse hinsichtlich Zellbindung und Zellaufnahme. Ob auch die Downregulation erhöht ist, muss noch in anderen Zellmodellen untersucht werden. Der Luciferase-Test mit sticky-siRNA verlief negativ.

Es bleibt zu hoffen, dass in Zukunft Nukleinsäure-Therapeutika durch Biokonjugate wie diese nebenwirkungsärmer und sicherer werden und somit eines Tages eine zielgerichtete (Krebs-) Therapie zur Verfügung steht.

6. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
dA / dT	Desoxyadenosin / Desoxythymidin
DARPin	Designed Ankyrin Repeat Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FBS	Fetales Bovines Serum
FCS	Fetales Kälber Serum
FPLC/ HPLC	Fast Protein Liquid Chromatography / High Performance LC
MDA-MB 468	Humane Brustadenokarzinom-Zelllinie
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline; salzhaltiger Phosphatpuffer
PLB	Passive Lysis Buffer; passiver Lysepuffer
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RNAi	RNA-Interferenz
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
ssiRNA	sticky siRNA
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7. Referenzen

- 1 Cerutti, H, Casas-Mollano, JA, 2006. "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." *Curr. Genet.* 50, S. 81–99
- 2 Hannon, G, 2002. "RNA interference." *Nature* 418, S. 244-251
- 3 Kurreck, J, 2009. "RNA interference: from basic research to therapeutic applications." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, S. 1378–1398
- 4 Ledford, H, 2010. "Drug giants turn their backs on RNA interference." *Nature.* 468, S. 487
- 5 Perrimon, N , Niand, JQ, Perkins, L, 2010. "In vivo RNAi: Today and Tomorrow." *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 2
- 6 Zhang, H, Kolb, F, Jaskiewicz, L, Westhof, E, Filipowicz, W, 2004. "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." *Cell* 118, S. 57-68
- 7 Bernstein, E, Caudy, A, Hammond, S, Hannon, G, 2001. "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* 409, S. 363-36
- 8 Jinek, M, Doudna, J, 2009. "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* 257, S. 405-412
- 9 Hammond, S, Bernstein, E, Beach, D, Hannon, G, 2000. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* 404, S. 293-296
- 10 Dipali, S, Doudna, J, 2010. "Structural insights into RNA Interference." *Current opinion in structural biology* 20, S. 90-97
- 11 Hair, P, Cameron, F, McKeage, K, 2013. "Mipomersen sodium: First global approval." *Drugs* 73, S. 487-493
- 12 Wang, J, Ze, L, Wientjes, G, Au, J, 2010. "Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers." *The AAPS journal* 12, S. 492-503
- 13 Leung, R, Whittaker, P, 2005. "RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics." *Pharmacology & therapeutics* 107, S. 222-239
- 14 Aagaard, L, Rossi, J, 2007. "RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, S. 75–86
- 15 Kaiser, P, Symons, A, Shah, S, Quinlan, E, Tabandeh, H, Do, D, Reisen, G, Lockridge, J, Short, B, Gueriolini, R, Nguyen, Q, 2010. "RNAi-Based Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration by Sirna-027." *American Journal of Ophthalmology* 150, S. 33-39

- 16 Burnett, J, Rossi, J, 2012. "RNA-based therapeutics: current progress and future prospects." *Chemistry & biology* 19, S. 60-71
- 17 Petrocca, F, Lieberman, J, 2011. "Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer." *Journal of Clinical Oncology* 29, S. 747-754
- 18 Ozpolat, B., Sood, A, Lopez-Berestein, G, 2010. "Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer." *Journal of internal medicine* 267, S. 44-53
- 19 Bora, R, Gupta, D, Mukkur, T, Saini, K, 2012. "RNA interference therapeutics for cancer: Challenges and opportunities (Review)" *Molecular Medicine Reports* 6, S. 9-15
- 20 Amstutz, P, 2007. "DARPin: a true alternative to antibodies." *Curr Opin Drug Discov Devel*, S. 153-159
- 21 Reynolds, A, Leake, D, Boese, Q, Scaringe, S, Marshall, WS, Khvorova, A, 2004. "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol*, S. 326-330
- 22 Corey DR, 2007. "Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference?" *J Clin Invest* 2007, S. 3615-3622
- 23 Winkler, J, 2011. "Nanomedicines based on recombinant fusion proteins for targeting therapeutic siRNA oligonucleotides." *Therapeutic Delivery*, Vol. 2, S. 891-905
- 24 Shukla, S, Sumaria, CS, Pradeepkumar, PI, 2010. "Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: A structural and functional outlook." *ChemMedChem*, Vol. 5, S. 328-349
- 25 Davis, ME, 2009. "The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: From concept to clinic." *Mol. Pharm.* 6, S. 659-668
- 26 Davis, ME, Zuckerman, JE, Choj, CHJ, et al, 2010. "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles." *Nature* 464, S. 1067-1070
- 27 Winkler J, Martin-Killias, P, Plückthun, A, Zangemeister-Wittke, U, 2009. "EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins." *Mol. Cancer Ther.* Vol. 8, S. 2674-2683
- 28 Simon, M, Zangemeister-Wittke, U, Plückthun, A, 2012. "Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries." *Bioconjugate chemistry* 23, S.279-286
- 29 Stumpp, MT, Binz, HK, Amstutz, P, 2008. "DARPin: a new generation of protein therapeutics." *Drug Discov. Today* Vol. 13, S. 695-701
- 30 Zahnd, C, Kawe, M, Stumpp, MT, et al, 2010. "Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: Effects of affinity and molecular size." *Cancer Res.* Vol. 70, S. 1595-1605

- 31 Binz, HK, Amstutz, P, Koh, I A, et al, 2004. "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries." *Nat. Biotechnol.* 22, S.575–582
- 32 Went, P, Lugli, A, Meier, S, Bundi, M, Mirlacher, M, Sauter, G, Dirnhofer, S, 2004. "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." *Human pathology* 35, S.122-128
- 33 Baeuerle, P, Gires, O, 2007. "EpCAM (CD326) finding its role in cancer." *British journal of cancer* 96, S. 417-423
- 34 Munz, M, Baeuerle, M, Gires, O, 2009. "The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling." *Cancer research* 69, S.5627-5629.
- 35 Jewett, JC, Bertozzi, CR, 2010. "Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology." *Chem. Soc. Rev.* 39 S. 1272
- 36 Becer, CR, Hoogenboom, R, Schubert, US, 2009. "Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition." *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, S. 2-11
- 37 Agard, NJ, Prescher, JA, Bertozzi, CR, 2004. "A Strain-promoted [3 + 2] Azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems." *J. Am. Chem.Soc.* 126, S. 15046-15047
- 38 Su, B, Cengizeroglu, A, et al, 2013. "Systemic TNF[alpha] Gene Therapy Synergizes With Liposomal Doxorubicine in the Treatment of Metastatic Cancer." *Molecular Therapy* 21, S. 300-308
- 39 Thell, M, 2014. "Entwicklung von sticky siRNAs und DNA-Tiles zur Multimerisierung und Komplexierung von siRNAs." *Diplomarbeit, Universität Wien*
- 40 Tot, E, 2014. "Stabile kovalente Konjugate von Designed Ankyrin Repeat Proteinen (DARPin)s mit therapeutischen Oligonukleotiden." *Diplomarbeit, Universität Wien*
- 41 Kolb, H. C., Finn, M, Sharpless, K, 2001. „Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen.“ *Angew. Chem.*, 113, S. 2056–2075

Alexander Fischnaller

Schüttelstraße 15a, 1020 Wien

Persönliche Daten

Name: Alexander Fischnaller
Geburtsdaten: 18.03.1989 in Linz
Mutter: Mag. Elisabeth Fischnaller
Beruf: Grafikdesignerin
Vater: Paul Fischnaller
Beruf: Medientechniker, Johannes Kepler Universität Linz

Schulbildung und Zivildienst

- April 2009 – Nov. 2014 Studium der Pharmazie in Wien
- Feb. 2008 – Dez. 2008 Zivildienst als Rettungssanitäter bei Rotem Kreuz Linz
- Okt. 2007 – Feb. 2008 Studium der Wirtschaftswissenschaften – JKU Linz
- Juni 2007 Matura mit „gutem Erfolg“ am Europagymnasium Auhof

Praktische Erfahrungen und Zusatzqualifikationen

- Juli – Aug. 2013 Praktikum bei Novartis Pharma Wien – Quality Assurance:
 - Mithilfe bei der Bearbeitung der jährlichen PQRs
 - Unterstützung im Freigabeprozess
 - Erstellung einer neuen Produktliste
 - Neugestaltung des Rückstelllagers in Zusammenarbeit mit Facility Management
 - Kontrolle der Mitarbeiter - SOPs
 - Bearbeitung von Kundenanfragen und Reklamationen gemeinsam mit Customer-Service
- Feb. 2012 Schnupperpraktika in den Krankenhausapotheken AKH – Linz und Landesnervenklinik Wagner – Jauregg
- Seit Juni 2009 Mitarbeiter bei Soccer5 Fußballhalle, Kinderfußballtrainer
- Seit Jän. 2009 Ehrenamtlicher Rettungssanitäter / Ärztenotdienstfahrer bei Rotem Kreuz Linz-Stadt und Gallneukirchen
- Okt. 2008 - März 2010 Ausbildung zum Privathubschrauberpiloten in Hörsching (PHPL)
- Feb. 2007 - Aug. 2007 Ausbildung zum Rettungssanitäter – Rotes Kreuz
- März 2005 – Jun. 2005 Besuch verschiedener Lehrveranstaltungen an der JKU – Linz Studienprogramm Biochemie im Rahmen der Begabtenförderung („Schüler an die Uni“)

Sprach- und EDV- Kenntnisse

- Englisch und Spanisch in Wort und Schrift
- MS Office, Powerpoint, Excel, ECDL, sehr gute allgemeine EDV Kenntnisse