

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 APTAMERE

### 1.1.1 *In vitro*-Selektion von Aptameren

Aptamere sind einzelsträngige (ss) DNA- oder RNA-Moleküle, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur und der Fähigkeit zur Ausbildung von starken Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrücken, Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden. Sie können, ähnlich wie monoklonale Antikörper, in verschiedensten Bereichen, von Diagnostik über Affinitätschromatographie bis hin zu therapeutischen Anwendungen, eingesetzt werden (siehe 1.1.3).

Aptamere werden durch den zyklischen Prozess der *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX) aus einer kombinatorischen Nukleinsäurebibliothek mit etwa  $10^{15}$  Molekülen isoliert (Gold *et al.* 1995). Aufgrund dieser enormen Komplexität kann die Anwesenheit von Liganden gegen praktisch jede Zielstruktur angenommen werden, so dass es theoretisch möglich ist, Aptamere gegen jedes beliebige Targetmolekül zu generieren.

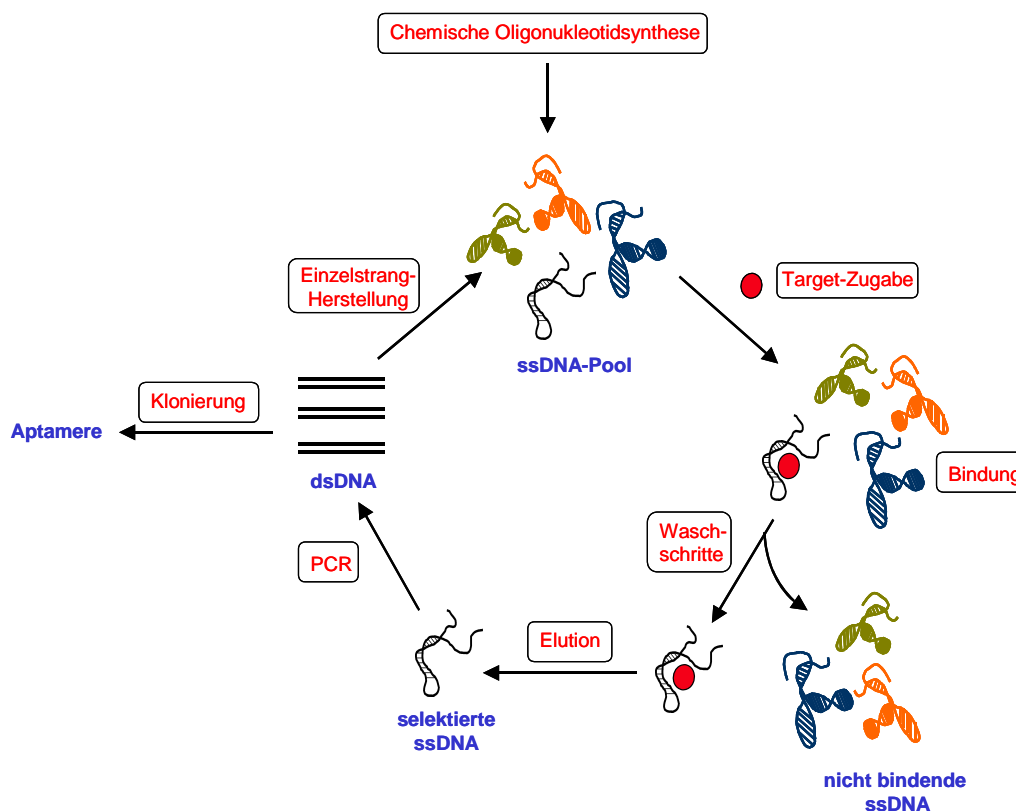
Das Akronym SELEX wurde 1990 von Tuerk und Gold eingeführt, als sie durch Sequenzvariation von acht Nukleotiden innerhalb des Hairpins einer RNA, die als Wildtyp die T4-DNA-Polymerase bindet, eine Variante mit gleichen Bindungseigenschaften isolieren konnten (Tuerk & Gold 1990). Im selben Jahr isolierten Ellington und Szostak aus einer RNA-Zufallsbibliothek Sequenzen, die verschiedene Farbstoffe erkennen konnten (Ellington & Szostak 1990). Diese bindenden RNA-Moleküle wurden Aptamere genannt (lat. *aptus*, passend).

Das Verfahren der *in vitro*-Selektion von Aptameren umfasst verschiedene molekularbiologische Methoden. Ursprünglich für RNA-Aptamere beschrieben, ist es mit leichten Veränderungen auch für die Selektion von DNA-Aptameren anwendbar. Der Ablauf einer *in vitro*-Selektion von Desoxyribonukleinsäuren ist in Abbildung 1 dargestellt.

Im Zuge einer automatischen Festphasensynthese wird zunächst eine ssDNA-Bibliothek erstellt. Diese umfasst einen randomisierten Bereich von üblicherweise 30 - 80 Nukleotiden, der auf beiden Seiten von konstanten Primerregionen begrenzt ist. Die Primerbereiche sind für die Amplifikation der selektierten Nukleinsäuren notwendig. Aus der Länge des variablen Bereichs ergibt sich die Komplexität der Bibliothek; ein Nukleinsäure-Pool mit einem randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden beinhaltet beispielsweise  $1,2 \cdot 10^{24}$  ( $4^{40}$ ) verschiedene Strukturen, von denen etwa  $10^{12}$  -  $10^{18}$  experimentell zu erreichen sind (Joyce 1994). Bevor die Nukleinsäuren in die Selektion eingesetzt werden, müssen sie in einer reproduzierbaren Konformation vorliegen, was durch Hitzedenaturierung und anschließende Renaturierung erreicht wird.

Zur Durchführung der Selektion gibt es unterschiedliche Strategien. Viele SELEX-Experimente von RNA-Aptameren gegen Proteine wurden im *Batch*-Verfahren durchgeführt. Hier werden die

Nukleinsäuren direkt mit dem freien Zielmolekül inkubiert. Nicht bindende Spezies werden im Anschluss über Nitrocellulose-Filter von den affinen Nukleinsäuren, die im Komplex mit dem Protein an die Filteroberfläche binden, abgetrennt (Tuerk & Gold 1990). Bei Selektionen gegen kleine Moleküle oder Peptide, die nicht durch Filtration zurückgehalten werden können, wurde häufig die Affinitätschromatographie eingesetzt (Ellington & Szostak 1990; Ferreira *et al.* 2006). Aufgrund ihrer einfachen Handhabung wurden in den letzten Jahren immer häufiger magnetische Partikel als Selektionsoberfläche verwendet (Mann *et al.* 2005; Stoltenburg *et al.* 2005; Wochner *et al.* 2007). An diese kann das jeweilige Targetmolekül entweder kovalent oder z. B. über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung immobilisiert werden. Durch Anlegen eines äußeren Magnetfelds können die targetbeladenen Beads zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren von der Inkubationslösung separiert werden. Um eine Anreicherung von oberflächenaffinen Spezies zu verhindern, werden so genannte Vorsäulen eingesetzt. Vor der eigentlichen Inkubation mit dem Zielmolekül wird die Bibliothek deshalb mit ungekoppeltem Matrixmaterial bzw., beim *Batch*-Verfahren, einem Nitrocellulosefilter inkubiert.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion von DNA-Aptameren.** Aus einer chemisch synthetisierten ssDNA-Bibliothek werden über den zyklischen Prozess von Bindung an das Zielmolekül, Entfernung der nicht bindenden Spezies und Amplifikation der eluierten, targetspezifischen Spezies affine DNA-Moleküle angereichert.

Um die nicht bindenden Spezies aus dem Pool zu entfernen, wird der Nukleinsäure-Target-Komplex mit Selektionspuffer gewaschen. Im Laufe der Runden kann die Stringenz durch Verlängerung der Waschzeit, Erhöhung des Waschvolumens oder der Waschschrte verstärkt werden, so dass höher affine Moleküle einen Selektionsvorteil haben und angereichert werden. Die Stringenz kann außerdem durch Reduktion des Zielmolekül-Nukleinsäure-Verhältnisses gesteigert werden.

Für die anschließende Elution der bindenden Nukleinsäuren gibt es die Möglichkeit der unspezifischen und der spezifischen Elution. Für die klassische unspezifische Elution wird ein denaturierender Puffer verwendet, der Hochsalz, SDS, Harnstoff, EDTA oder Kombinationen davon enthält. Auch eine zusätzliche Hitzedenaturierung ist möglich (Tao & Frankel 1996; Srisawat & Engelke 2001; Vater *et al.* 2003; Stoltenburg *et al.* 2005). Durch die Denaturierung wird die dreidimensionale Struktur der Nukleinsäuren zerstört, so dass sie ihre Bindungsfähigkeit verlieren. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass alle im Reaktionsgefäß vorhandenen Nukleinsäuren eluiert werden, einschließlich Matrix- und Plastik-Bindern, die sich an die Oberfläche der Reaktionsgefäße geheftet haben. Eine Möglichkeit, Binder spezifisch zu eluieren, ist die kompetitive Elution. Hier wird ein Überschuss des Zielmoleküls eingesetzt, um bindende Spezies vom immobilisierten Target zu lösen (Connell *et al.* 1993; Sassanfar & Szostak 1993; Kiga *et al.* 1998; Koizumi & Breaker 2000). Bei dieser Methode ist zwar die Spezifität der Elution gegeben, jedoch sind große Mengen Zielmolekül nötig, was im Falle von Proteinen schwierig und kostspielig sein kann. Außerdem besteht die Gefahr, dass wirklich affine Binder nicht abgelöst werden können. Bei der Selektion von Aptameren gegen Proteine bietet der Abbau des Targetproteins durch die Serin-Protease Proteinase K eine Möglichkeit zur spezifischen Elution, da ausschließlich die bindenden Nukleinsäuren nach der Zerstörung des Proteins abgelöst werden. Eine elegante Strategie, Binder hoch spezifisch zu eluieren, bietet die reversible Immobilisierung des Zielmoleküls. Ist dieses z. B. über eine Disulfidbrücke an die Oberfläche gekoppelt, kann es zusammen mit den gebundenen Nukleinsäuren durch Reduktion, beispielsweise mit DTT, abgespalten werden (Nieuwlandt *et al.* 1995; Wochner *et al.* 2007). Im Falle von Proteinen ist eine reversible Immobilisierung des Targets auch über His-Tag an Ni-NTA oder durch Integration hydrolysierbarer Signalsequenzen möglich.

Die eluierten Nukleinsäuren müssen anschließend amplifiziert werden. Hier unterscheiden sich die DNA- und die RNA-Selektion. RNA wird über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und über PCR amplifiziert, wobei über den Primer ein T7-Promotor für die anschließende *in vitro*-Transkription eingebaut wird. Bei der DNA-Selektion kann die ssDNA direkt über PCR amplifiziert werden. Um aus dem Doppelstrang im Anschluss ssDNA zu isolieren, müssen modifizierte Primer verwendet werden. Entweder wird der Gegenstrang durch einen Primer mit Peptidlinker verlängert, wodurch die Trennung der beiden Stränge über eine anschließende Gelelektrophorese möglich ist (Mann *et al.* 2005). Auch die Biotinylierung des Gegenstrangs mit anschließender Kopplung an streptavidinbeschichtete magnetische Partikel und Alkali-Denaturierung generiert den einzelsträngigen *sense*-Strang (Wochner *et al.* 2007). Eine weitere Möglichkeit zur Einzelstranggewinnung bietet die asymmetrische PCR, bei der ein großer Überschuss eines Primers verwendet wird, um hauptsächlich den gewünschten Strang zu verlängern (Ferreira *et al.* 2006). Außerdem kann das Enzym Lambda-Exonuklease zur Einzelstrangherstellung eingesetzt werden. Dieses Enzym baut den phosphorylierten Strang in einem

doppelsträngigen DNA-Molekül ab. Deshalb muss der Gegenstrang im Zuge der PCR mit Hilfe eines entsprechend modifizierten Primers phosphoryliert werden.

Die angereicherte einzelsträngige Bibliothek kann anschließend in die nächste Runde eingesetzt werden. Während mit jedem Selektionszyklus die affinen Moleküle exponentiell angereichert werden, verringert sich die Komplexität in den meisten Selektionsexperimenten theoretisch um einen Faktor 100 - 1000 pro Runde. So sollte sich die Komplexität des Startpools nach fünf Zyklen um den Faktor  $10^{10}$  -  $10^{15}$  (Dahmen 1998) verringert haben. Zur Bestimmung der besten Selektionsbedingungen wurden auch mathematische Berechnungen und Computersimulationen durchgeführt (Irvine *et al.* 1991; Sun *et al.* 1996; Vant-Hull *et al.* 1998).

Bei genügender Anreicherung wird die doppelsträngige (ds) DNA nach der PCR kloniert und durch Transformation in *E. coli* vereinzelt. Die Einzelklone werden sequenziert und auf ähnliche Sequenzen untersucht, die Aufschluss über mögliche Bindungsmotive geben.

Um den häufig langwierigen, repetitiven Prozess der Selektion zu beschleunigen, wurde dieser automatisiert. Für RNA-Aptamere wurde eine automatisierte Selektionsprozedur auf magnetischen Partikeln entwickelt (Cox *et al.* 1998; Cox & Ellington 2001; Blind *et al.* 2002; Cox *et al.* 2002a; Cox *et al.* 2002b; Rajendran & Ellington 2003). Außerdem wurden automatisierte Selektionen, die nicht auf magnetischen Partikeln beruhen, für RNA (Eulberg *et al.* 2005a) und DNA (Zhang *et al.* 2000) beschrieben.

Weitere Varianten der SELEX wurden entwickelt, um die Prozedur zu optimieren oder eine bessere Anpassung für die jeweiligen Anwendungen zu ermöglichen.

Bei der CE (*capillary electrophoresis*)-SELEX werden Targetmolekül-Nukleinsäure-Komplexe über Kapillarelektrophorese von nicht bindenden Sequenzen getrennt. Diese Trennung ist effektiver als die der konventionellen SELEX, so dass weniger Zyklen notwendig sind, um hoch affine Aptamere zu isolieren (Mendonsa & Bowser 2004a, b; Mosing *et al.* 2005; Mallikaratchy *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006). Diese Methode eignet sich hauptsächlich für die Selektion von Aptameren gegen Proteine oder Proteinkonjugate, da das Target groß genug sein muss, um den Lauf der gebundenen Nukleinsäuren für eine Abtrennung ausreichend zu retardieren.

Da Aptamere für größere und kommerzielle Anwendungen über chemische Festphasensynthese hergestellt werden, die mit steigender Länge uneffektiv und teuer wird, spielt die Länge der Sequenzen eine wichtige Rolle. Die Aptamere werden deshalb im Allgemeinen auf die bindungsrelevanten Sequenzbereiche verkürzt, was jedoch ein schwieriger und arbeitsintensiver Prozess ist. Um diesen zu umgehen, wurde die *tailored*-SELEX (Vater *et al.* 2003) entwickelt. Hier wird der randomisierte Bereich einer RNA-Bibliothek von insgesamt nur zehn fixen Nukleotiden begrenzt; die für die Amplifikation nötigen Primerbereiche inklusive T7-Promotorsequenzen werden über Adapter vor der PCR angefügt und anschließend wieder entfernt. Dies ist über alkalische Hydrolyse möglich, da der reverse Primer Ribonukleotide enthält.

Um die Vorteile der *tailored*-SELEX zu nutzen, das Prozedere jedoch zu beschleunigen und für eine Automatisierung nutzbar zu machen, wurde die *primerless selection* entwickelt (Jarosch *et al.* 2006).

Diese nutzt eine duale RNA-Bibliothek, bei der ein T3- und ein T7-Promotor aufeinander folgen. Durch Transkription mit T3-RNA-Polymerase wird die RNA-Bibliothek, einschließlich Primerbindungsstellen und T7-Promotor, in voller Länge synthetisiert. Selektionsrunden mit dieser Bibliothek verlaufen schnell. Die T7-RNA-Polymerase hingegen transkribiert nur den randomisierten Bereich plus den in der *tailored*-SELEX beschriebenen fixen Nukleotiden an den 5'- und 3'-Enden. Die Primerbereiche werden bei der verkürzten Bibliothek wiederum über Adapter angefügt und nach Amplifikation über alkalische Hydrolyse entfernt. Durch den Wechsel zwischen verschiedenen Bibliothekslängen wird sichergestellt, dass die Bindungseigenschaften der selektierten Aptamere unabhängig von den Primersequenzen sind.

Für die Isolierung von Aptameren gegen therapeutisch relevante Proteine wurde die so genannte *toggle*-SELEX entwickelt (White *et al.* 2001). Hierbei wird die Selektion alternierend mit humanem und tierischem Zielprotein durchgeführt, so dass Aptamere generiert werden, die sowohl im Tierversuch als auch im Menschen funktionstüchtig sind.

Da der Eintrag (*delivery*) von Aptameren in die Zelle aufgrund ihrer negativen Ladung wie bei allen therapeutischen Nukleinsäuren schwierig ist, wurden Systeme entwickelt, die die Expression von RNA-Aptameren in der Zelle erlauben. Normalerweise werden RNAs als Teil eines längeren Transkripts exprimiert. Im Falle einer Aptamer-Expression können die so zusätzlich eingeführten flankierenden Sequenzen die richtige Faltung des Aptamers stören. Bei der *expression cassette*-SELEX wurden an das 5'- und das 3'-Ende der eigentlichen Aptamersequenz zusätzliche randomisierte Bereiche kloniert und der RNA-Pool erneuten Selektionsrunden unterzogen. Auf diese Weise wurden die flankierenden Sequenzen eines Expressionssystems, die für die *in vivo*-Expression nötig sind, in das funktionelle Aptamer integriert (Martell *et al.* 2002; Mi *et al.* 2006). Außerdem wurde eine Expressionsstrategie beschrieben, die die Expression von „reinem“ RNA-Aptamer erlaubt. Hierfür wurde ein adenoviraler Vektor mit einem H1-RNA-Polymerase III-Promotor verwendet (Mi *et al.* 2006).

Für unbekannte oder schwer zu isolierende Oberflächenproteine wurde eine Selektionsprozedur direkt auf Zellen entwickelt (Daniels *et al.* 2003; Cerchia *et al.* 2005).

### 1.1.2 Aptamere gegen kleine Moleküle

Mit ihrer *in vitro*-Selektion waren Ellington und Szostak die ersten, die eine randomisierte RNA-Bibliothek ohne Strukturvorgaben nutzten, um spezifische ligandenbindende Nukleinsäuren zu isolieren (Ellington & Szostak 1990). Dabei selektierten sie Aptamere gegen verschiedene organische Farbstoffe, da diese metabolischen Cofaktoren ähneln können und somit potentiell „gute“ Targets für Nukleinsäuren darstellen. Seit diesen ersten Selektionsexperimenten wurde eine Vielzahl an RNA-Aptameren gegen kleine Moleküle beschrieben.

Mit Nukleotiden, Nukleosiden bzw. Nukleobasen als Target wurden Selektionen gegen Adenosin (Sassanfar & Szostak 1993), Xanthin und Guanin (Kiga *et al.* 1998), cAMP (Koizumi & Breaker 2000) sowie gegen Adenin (Meli *et al.* 2002) durchgeführt. Auch gegen ATP wurden Aptamere isoliert, die ebenfalls die Triphosphate GTP, UTP und CTP erkannten; die Affinität zum Monophosphat AMP war

jedoch mehr als 150-fach niedriger (Sazani *et al.* 2004). Enantioselektive RNA-Aptamere wurden gegen L-Adenosin selektiert; diese Aptamere banden L-Adenosin, nicht jedoch das Stereoisomer D-Adenosin (Klussmann *et al.* 1996).

Auch gegen Cofaktoren wie S-Adenosyl-Methionin (SAM) (Burke & Gold 1997), S-Adenosyl-Homocystein (SAH) (Gebhardt *et al.* 2000), Cyanocobalamin (Lorsch & Szostak 1994), Coenzym A (Burke & Hoffman 1998; Saran *et al.* 2003) und Biotin (Wilson *et al.* 1998) wurden Aptamere selektiert, ebenso wie gegen Flavin- und Nikotinamid-Cofaktoren (Lauhon & Szostak 1995; Roychowdhury-Saha *et al.* 2002). Lauhon und Szostak konnten für ein Beispielaptamer zeigen, dass RNA- und DNA-Aptamere mit identischer Sequenz dasselbe Targetmolekül binden können. Sie „übersetzten“ das von ihnen isolierte RNA-Aptamer gegen Riboflavin in ein DNA-Aptamer und erhielten so eine DNA-Version des Aptamers, das mit geringfügig niedrigerer Affinität an Riboflavin band.

Diverse Aptamere wurden gegen Aminosäuren beschrieben, so beispielsweise gegen L-Arginin (Connell *et al.* 1993; Geiger *et al.* 1996; Tao & Frankel 1996), L-Histidin (Majerfeld *et al.* 2005), L-Valin oder L-Isoleucin (Majerfeld & Yarus 1994). Auch gegen das nicht natürlich vorkommende D-Arginin wurden Aptamere isoliert (Nolte *et al.* 1996). Ein Aptamer gegen L-Citrullin (Famulok 1994) konnte in anschließenden *in vitro*-Evolutionsexperimenten in ein L-Arginin-Aptamer umgewandelt werden, wobei sich die beiden Aptamere nur in drei Nukleotiden des konservierten Bereichs unterscheiden. Bei der *in vitro*-Evolution werden durch mutagene Reaktionsbedingungen während der Amplifikation geringfügige Veränderungen der ursprünglichen Sequenz – und damit der Eigenschaften – gefördert. In ähnlicher Art und Weise wurde aus einem Dopamin-Aptamer (Mannironi *et al.* 1997) über *in vitro*-Evolution ein Tyrosin-Aptamer hergestellt (Mannironi *et al.* 2000).

Im Bereich der Naturstoffe wurde ein Aptamer gegen Theophyllin isoliert. Für diese Selektion wurde zum ersten Mal das Prinzip der Gegenselektion (*counter selection*) beschrieben. Durch Gegenselektion mit einem strukturell ähnlichen Molekül wird die Spezifität der selektierten Aptamere beträchtlich erhöht. In diesem Fall wurde eine tausendfach bessere Bindung an Theophyllin als an Koffein beobachtet, das sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe unterscheidet (Jenison *et al.* 1994). Zahlreiche Aptamere wurden außerdem gegen organische und Fluoreszenzfarbstoffe selektiert (Ellington & Szostak 1990; Holeman *et al.* 1998), von denen das Malachitgrün-Aptamer (Grate & Wilson 1999) besonders gut charakterisiert ist (Baugh *et al.* 2000; Grate & Wilson 2001; Babendure *et al.* 2003; Flinders *et al.* 2004; Stojanovic & Kolpashchikov 2004).

Auch Antibiotika wurden als Zielmoleküle in *in vitro*-Selektionen eingesetzt. Aptamere gegen die Aminoglykosid-Antibiotika Tobramycin (Wang & Rando 1995; Wang *et al.* 1996; Jiang *et al.* 1999), Lividomycin (Lato & Ellington 1996), Kanamycin A (Wang *et al.* 1996), Kanamycin B (Kwon *et al.* 2001), Neomycin B (Wallis *et al.* 1995) und Streptomycin (Wallace & Schroeder 1998; Bachler *et al.* 1999) wurden beschrieben. Gegen Chloramphenicol (Burke *et al.* 1997), Tetracyclin (Berens *et al.* 2001) und das Peptid-Antibiotikum Viomycin (Wallis *et al.* 1997) wurden ebenfalls RNA-Aptamere isoliert.

Auch DNA-Aptamere gegen kleine Moleküle wurden selektiert. Analog zu ihrer RNA-Selektion (Ellington & Szostak 1990) konnten Ellington und Szostak demonstrieren, dass auch ssDNA in der

Lage ist, organische Farbstoffe zu binden (Ellington & Szostak 1992). Obwohl die Selektion gegen die gleichen Farbstoffe durchgeführt wurde, zeigten die erhaltenen DNA-Aptamere keine Sequenzähnlichkeit mit den RNA-Aptameren. DNA-Aptamere wurden außerdem gegen Adenosin und ATP (Huizenga & Szostak 1995), L-Arginin (Harada & Frankel 1995), L-Tyrosinamid (Vianini *et al.* 2001), anionische Porphyrine (Li *et al.* 1996), Kokain (Stojanovic *et al.* 2001; Stojanovic & Landry 2002), Cholinsäure (Kato *et al.* 2000), Ethanolamin (Mann *et al.* 2005) und (R)-Thalidomid (Shoji *et al.* 2007) selektiert. Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich zur großen Anzahl an RNA-Aptameren erst relativ wenige DNA-Aptamere gegen kleine Moleküle beschrieben wurden.

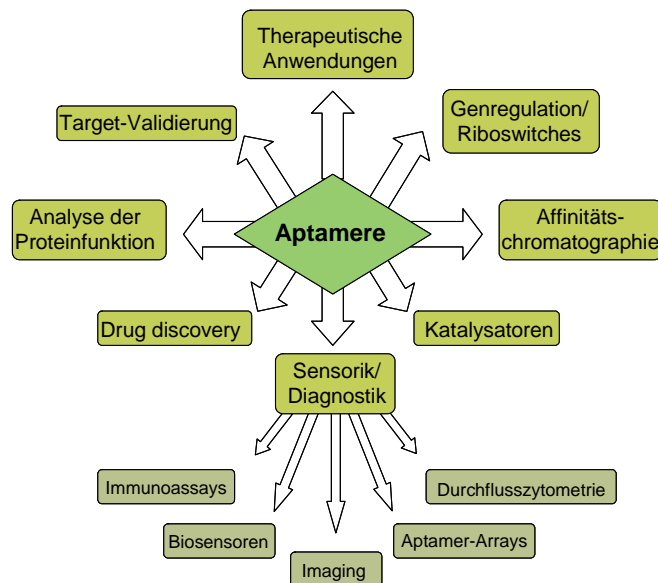
Dass die spezifische Bindung kleiner Liganden an Nukleinsäuren nicht nur *in vitro* von Bedeutung ist, sondern vielmehr auch in der Natur genutzt wird, zeigte die Entdeckung von Riboswitches. Diese metabolitbindenden mRNAs werden in Bakterien zur Kontrolle der Genexpression genutzt. Ligandenbindung an die „Aptamer-Domäne“ induziert eine Strukturänderung der RNA, die dann entweder durch Ausbildung alternativer Terminationsstrukturen die Transkription oder auf Translationsebene die Bindung des Ribosoms regulieren kann (Blount & Breaker 2006). Bekannte Metabolite für Riboswitches sind Coenzym B12 (Nahvi *et al.* 2002), Thiamin-Pyrophosphat (TPP) (Winkler *et al.* 2002a), Glycin (Mandal *et al.* 2004), Flavinmononukleotid (FMN) (Winkler *et al.* 2002b), SAM (Winkler *et al.* 2003; Corbino *et al.* 2005), Guanin (Mandal *et al.* 2003), Adenin (Mandal & Breaker 2004), Lysin (Sudarsan *et al.* 2003) und Glucosamin-6-phosphat (Winkler *et al.* 2004).

### 1.1.3 Aptamere in Sensorik und Diagnostik

Aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität, die mit der von monoklonalen Antikörpern vergleichbar ist, sind die potentiellen Anwendungsgebiete von Aptameren breit gefächert (Abbildung 2). Während Antikörper in den letzten Jahrzehnten das richtungsweisende Reagenz waren, lassen die Vorteile, die Aptamere bieten, jedoch erwarten, dass sie deren bis dato vorhandene Sonderstellung streitig machen können.

Aptamere werden zum Ersten *in vitro* hergestellt, so dass auf die für Antikörperentwicklung nötigen Tierversuche und Abhängigkeiten von *in vivo*-Bedingungen verzichtet werden kann. Ein weiterer Vorteil, der sich hieraus ergibt, ist die Chargenunabhängigkeit, da Aptamere reproduzierbar chemisch synthetisiert werden können. Auch die Selektionsbedingungen können an die spätere Applikation angepasst werden. Auf diese Weise können Aptamere generiert werden, die beispielsweise bei höheren Temperaturen (Hicke *et al.* 1996) oder in der reduktiven Umgebung der Zelle als Intramere (intrazelluläre Aptamere) funktionstüchtig sind, während Antikörper dort denaturiert würden. Außerdem ist die Selektion von Aptameren gegen kleine, nicht immunogene oder toxische Moleküle möglich. Auch Reportermoleküle wie Fluoreszenzfarbstoffe oder Biotin können ortsspezifisch an definierten Stellen des Aptamers eingefügt werden (Drolet *et al.* 1996; Drolet *et al.* 1998). Aptamere können reversibel denaturiert werden, wodurch sie über einen langen Zeitraum stabil aufbewahrt und transportiert werden können. Auch eine Wiederverwendung ist so möglich. Eine Einschränkung bei der Anwendung von Nukleinsäuren bei biologischen Proben ist ihre Empfindlichkeit gegenüber

Nukleasen. Jedoch kann auch dieses Manko durch Einführung von nukleaseresistenten Modifikationen wie 2'-Fluoro-, 2'-Amino-, 2'-O-Methyl-, Thio-, LNA- (*locked nucleic acid*), PNA- (*peptide nucleic acid*) ausgeglichen werden (Green *et al.* 1995; Jellinek *et al.* 1995; Lin *et al.* 1996; Kubik *et al.* 1997; Pagratis *et al.* 1997; Schmidt *et al.* 2004; Burmeister *et al.* 2005; Burmeister *et al.* 2006). Auch die Spiegelmer-Technologie, bei der anstelle der natürlich vorkommenden D-RNAs die spiegelbildlichen L-RNAs zum Aufbau der Aptamere verwendet werden, bietet eine Alternative. Da L-RNAs nicht in der Natur vorkommen, gibt es keine Enzyme, die Spiegelmere abbauen (Klussmann *et al.* 1996; Nolte *et al.* 1996).



**Abbildung 2: Anwendungsfelder von Aptameren.**

Der erste auf Aptameren basierende diagnostische Test wurde von Drolet *et al.* beschrieben (Drolet *et al.* 1996; Drolet *et al.* 1998). Bei diesem *enzyme-linked oligonucleotide assay* (ELONA) wurden Fänger-Antikörper gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Bindung des Proteins wurden fluoresceinmarkierte anti-VEGF-Aptamere zugegeben. Da die Sensitivität für eine direkte Detektion der Fluoreszenz nicht ausreichte, wurde zusätzlich mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Fluorescein-Antikörper inkubiert, so dass eine Quantifizierung über Chemolumineszenz möglich war. Für Thrombin wurde außerdem ein kompetitiver Immunoassay (*displacement enzyme-linked aptamer assay, displacement ELAA*) mit enzymmarkiertem Substrat beschrieben (Baldrich *et al.* 2005).

Auch wurden verschiedenartige Biosensoren auf Aptamerbasis entwickelt. Der Begriff Biosensor wird dabei für einen Aufbau verwendet, in dem eine biologische Komponente (hier das Aptamer) unmittelbar mit einem Signalwandler (z. B. einer Elektrode, einer optischen Faser, einem Piezokristall oder einem Transistor) verbunden ist. Sowohl optische als auch elektrochemische Biosensoren mit Enzym-, Fluorophor- oder Nanopartikel-Markierung sowie markierungsfreier Detektion wurden beschrieben.



Eines der ersten Beispiele für einen optischen Biosensor auf Aptamerbasis wurde für die Detektion von L-Adenosin beschrieben. Ein RNA-Aptamer wurde dafür über Biotin an eine avidinbeschichtete Glasfaser gekoppelt und die Bindung von fluoresceinmarkiertem L-Adenosin über Totalreflexion der Fluoreszenz gemessen (Kleinjung *et al.* 1998).

Auch Aptabeacons besitzen großes Potenzial für die Sensorik. Wie bei *molecular beacons* wird bei Aptabeacons durch ligandeninduzierte Strukturänderung das im Molekül eingebaute Fluorophor-/Quencher- oder FRET-Paar getrennt, was zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals führt (Li *et al.* 2002; Rajendran & Ellington 2003; Levy *et al.* 2005). Um aus einem Thrombin-Aptamer ein Aptabeacon herzustellen, ligierten Hamaguchi *et al.* einige zum 3'-Ende komplementäre Nukleotide zusammen mit einem Fluorophor ans 5'-Ende des anti-Thrombin-Aptamers, wodurch eine Haarnadelstruktur ausgebildet wurde. Das 3'-Ende des Aptamers wurde zusätzlich mit einem Quencher markiert. In Abwesenheit des Liganden wurde die Fluoreszenz so gequencht. In Anwesenheit von Thrombin wurden Fluorophor und Quencher durch ligandeninduzierte Strukturänderung getrennt, was zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führte (Hamaguchi *et al.* 2001). Eine alternative Strategie, die Strukturänderung des Aptamers zum optischen Nachweis der Ligandenbindung auszunutzen, ist die Verwendung von zwei kurzen, zur Aptamersequenz komplementären Oligonukleotiden, die ebenfalls mit einem Fluorophor (F-DNA) bzw. Quencher (Q-DNA) markiert sind und die durch Ligandenbindung vom Aptamer getrennt werden. Eine direkte Fluoreszenzmarkierung des Aptamers ist ebenfalls möglich (Nutiu & Li 2003, 2004).

Auch Aptazyme wurden als optische Biosensoren verwendet. Aptazyme besitzen sowohl die aptamer-typische Fähigkeit zur Ligandenbindung als auch katalytische Eigenschaften. Eine durch Ligandenbindung induzierte Änderung in der Bindungsdomäne wird auf die katalytische Domäne übertragen, was zu einer Modulation der katalytischen Aktivität führt. Durch Einbau von zwei optisch aktiven Molekülen (Fluorophor-/Quencher-Paar, FRET-Paar) im Substratstrang des katalytischen Moduls können Änderungen in der Fluoreszenz so auf eine Ligandenbindung schließen lassen. Famulok *et al.* nutzten dieses Prinzip, um Bibliotheken kleiner Moleküle nach solchen zu untersuchen, die an das Rev-Protein binden und so als Wirkstoff für die Inhibition von HIV-1 dienen könnten. Der Ribozym-Anteil ihres Reporterribozyms wurde durch Bindung von Rev an die Bindungsdomäne inaktiviert. Als Bindungsdomäne diente beim *proof of principle* das natürliche *Rev response element* (RRE). Verdrängung von Rev durch kleine Liganden führte zur Strukturänderung des Aptazyms, zur Aktivierung des Ribozymanteils, zur katalytischen Spaltung des Substratstrangs und damit zur Änderung des Fluoreszenzsignals (Hartig & Famulok 2002; Hartig *et al.* 2002).

Die ligandeninduzierte Strukturänderung wurde für das Thrombin-Aptamer auch über wasserlösliche, kationische Polythiophen-Derivate detektiert, die die Faltung des Komplexes in ein optisches (colorimetrisches oder fluorometrisches) Signal umwandeln können, wobei weder das Aptamer noch das Target markiert werden mussten (Ho & Leclerc 2004).

Auch mit Aptameren gekoppelte Goldnanopartikel wurden für die Detektion von Thrombin in Lösung und auf Oberflächen verwendet (Pavlov *et al.* 2004). Auf Nitrocellulose-Teststreifen wurde zum Nachweis von Adenosin mit Hilfe von Aptameren ebenfalls Nanogold eingesetzt (Liu *et al.* 2006).

Neben optischen Biosensoren, die aufgrund der Instrumentierung relativ teuer und außerdem empfindlich für Photobleichung sind, wurden diverse elektrochemische Biosensoren auf Aptamerbasis entwickelt (Bruno & Kiel 1999; Liss *et al.* 2002; Minunni *et al.* 2004; Bang *et al.* 2005; Hianik *et al.* 2005; Rodriguez *et al.* 2005; Xiao *et al.* 2005b; Xu *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2006). Elektrochemische Signalübertragung bietet die Vorteile hoher Empfindlichkeit, schneller Auswertung, niedriger Produktionskosten und die Möglichkeit zur Miniaturisierung. Außerdem gibt es eine große Bandbreite an verschiedenen Detektionsmöglichkeiten, die je nach Anforderung des jeweiligen Systems gewählt werden können.

Zum Aufbau eines elektrochemischen Sensors zur Detektion von Thrombin wurden beispielsweise zwei Aptamere verwendet, die unterschiedliche Regionen des Proteins erkennen. Eines wurde als Fänger-Aptamer auf eine Goldelektrode immobilisiert, das zweite Aptamer wurde als Detektions-Aptamer mit Pyrrolochinolinchinon-Glukose-Dehydrogenase gekoppelt. In Anwesenheit von Glukose fließt nach Komplexbildung von Thrombin, Fänger- und Detektions-Aptamer ein elektrischer Strom, der direkt von der Thrombin-Konzentration abhängig ist (Ikebukuro *et al.* 2005). Ein ähnliches Prinzip wurde mit Meerrettich-Peroxidase (Mir *et al.* 2006) und Platinanopartikeln beschrieben (Polsky *et al.* 2006).

Xiao *et al.* entwickelten einen elektronischen Sensor auf Aptamerbasis (*electronic aptamer-based sensor*, E-AB), der keine exogenen Labels benötigt. Bei diesem Sensor ist ein mit Methylenblau gekoppeltes Thrombin-Aptamer auf einer Goldelektrode immobilisiert. In Abwesenheit von Thrombin liegt das Aptamer relativ ungefaltet und beweglich vor, wobei das Methylenblau mit der Elektrode kollidieren und ein Elektron übertragen kann. Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung des Aptamers in eine starre Form, wodurch der Abstand von Methylenblau und Elektrode vergrößert wird, so dass kein Elektronentransfer mehr möglich ist (Xiao *et al.* 2005a). Ein ebenfalls auf der Markierung mit Methylenblau basierender elektrochemischer Aptasensor wurde von Baker *et al.* für die Detektion von Kokain beschrieben. Hier macht die ligandeninduzierte Konformationsänderung den Elektronentransfer von Methylenblau auf die Elektrode erst möglich (Baker *et al.* 2006).

Auch Aptamer-Mikroarrays wurden beschrieben (Ferguson *et al.* 1996; McCauley *et al.* 2003). Für die Detektion von Thrombin wurden bei einem faseroptischen Biosensor anti-Thrombin-Aptamere an die Oberfläche von Silica-Mikrokügelchen gekoppelt und diese in Mikrowells einer optischen Faser verteilt. Nach Bindung von fluoreszenzmarkiertem Thrombin wurde die Abnahme der Fluoreszenz durch kompetitive Verdrängung mit unmarkiertem Thrombin gemessen (Lee & Walt 2000).

Im Durchflusszytometer (FACS, *fluorescence activated cell sorter*) können Aptamere direkt zum Nachweis bestimmter Oberflächenstrukturen genutzt werden. Davis *et al.* koppelten dafür humane neutrophile Elastase (HNE) auf Polystyrol-Kügelchen. Nach Inkubation mit einem fluoreszenzmarkiertem HNE-Aptamer konnten die mit dem HNE-Aptamer-Komplex beladenen Partikel in einem Durchflusszytometer von unbeschichteten Kügelchen getrennt werden (Davis *et al.* 1996). Das Prinzip konnte auf Zellen übertragen werden: Fluoreszenzmarkierte anti-CD4-Aptamere erkannten ihre Zielstruktur auf der Oberfläche von T-Zellen. So konnten CD4-exprimierende Zellen in einer heterogenen Zellpopulation nachgewiesen werden (Davis *et al.* 1998).

Auch für das *in vivo*-Imaging bieten Aptamere einige Vorteile. Sie können – im Gegensatz zu Antikörpern – durch ihre vergleichsweise geringe Größe schnell Gewebe und Tumoren durchdringen, sind nicht immunogen und werden schnell wieder aus dem Blut entfernt. Aufgrund ihrer schlechten Aufnahme in die Zelle werden vor allem extrazelluläre Targets wie Tenascin-C (Hicke *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 2004; Hicke *et al.* 2006), PSMA (*prostate specific membrane antigen*) (Lupold *et al.* 2002) oder Mucin 1 (MUC1) (Ferreira *et al.* 2006; Borbas *et al.* 2007; Perkins & Missailidis 2007) adressiert. Die Aptamere werden meist durch ortsspezifische Kopplung eines bifunktionalen Chelators am 5'- oder 3'-Ende radioaktiv markiert. Bei 5'-Markierung wird das 3'-Ende häufig gleichzeitig geschützt, um den Abbau durch Exonukleasen zu verhindern. Radioaktive Isotope mit kurzer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) wie  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6 \text{ h}$ ) oder  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 2 \text{ h}$ ) werden dafür verwendet. Auch Multimere, bei denen mehrere Aptamere an einen Chelatbildner gekoppelt sind, wurden beschrieben. Diese erhöhen das Molekulargewicht und damit die Retentionszeit, um die Visualisierung des Tumors zu verbessern. Außerdem soll durch den kumulativen Effekt die Stabilität der Bindung erhöht werden (Borbas *et al.* 2007; Perkins & Missailidis 2007).

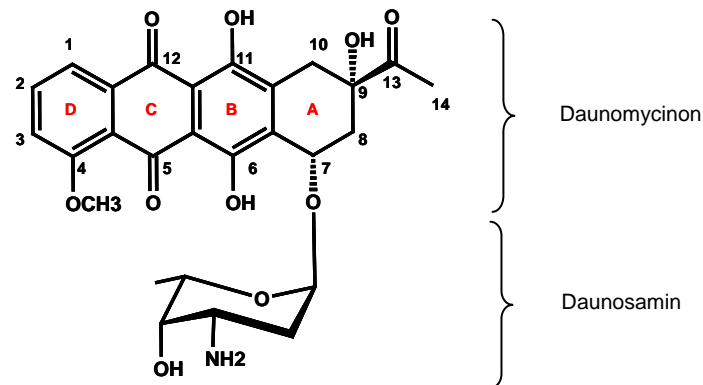
Neben den verschiedenen diagnostischen Anwendungen soll das Potenzial von Aptameren als Therapeutika noch erwähnt werden. Mit Macugen<sup>®</sup> ist ein erstes Medikament auf Aptamerbasis zugelassen (FDA 2004; Que-Gewirth & Sullenger 2007). Dieses PEGylierte, 2'-Fluoro-Pyrimidin- und 2'-O-Methyl-Purin-substituierte 27mer RNA-Aptamer ist gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet und kann zur Behandlung von altersbedingter Maculadegeneration eingesetzt werden (Ruckman *et al.* 1998; EyetechStudyGroup 2002, 2003; Cunningham *et al.* 2005; Ng & Adamis 2005; Siddiqui & Keating 2005; Ng & Adamis 2006; Ng *et al.* 2006).

Besonders interessant für einen therapeutischen Einsatz ist die Regulierbarkeit der Aptamere (Rusconi *et al.* 2002; Rusconi *et al.* 2004). Durch Zugabe eines Gegenmittels (*antidote*), eines zu Teilen des Aptamers komplementären Oligonukleotids, kann die Funktion des Aptamers kontrolliert inhibiert werden. Wenn Aptamere nicht selbst als aktives Therapeutikum eingesetzt werden, können sie auch genutzt werden, um zellspezifisch therapeutische Moleküle in die Zellen zu transportieren. Konjugate aus einem oberflächenrezeptorspezifischem Aptamer und siRNA (Chu *et al.* 2006b; McNamara *et al.* 2006), Toxinen (Chu *et al.* 2006a), Nanopartikeln mit eingeschlossenen Wirkstoffen (Farokhzad *et al.* 2004; Farokhzad *et al.* 2006a; Farokhzad *et al.* 2006b) und interkalierenden Zytostatika (Bagalkot *et al.* 2006) wurden hierfür beschrieben.

## 1.2 DAUNORUBICIN

Daunorubicin gehört zur Gruppe der Anthracyclin-Antibiotika und wurde 1963 als „Daunomycin“ von einer italienischen (Dimarco *et al.* 1963) und als „Rubidomycin“ (Dubost *et al.* 1963) von einer französischen Arbeitsgruppe aus *Streptomyces peucetius*-Kulturen isoliert. Der heutige Name Daunorubicin ist aus beiden Namen zusammengesetzt.

Daunorubicin besteht aus einem tetrazyklischen, planaren, polyaromatischen Ringsystem, dem Daunomycinon, das über eine glykosidische Bindung mit einem Aminozucker, dem Daunosamin, verbunden ist (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Struktur von Daunorubicin.** Die Buchstaben (A-D) kennzeichnen die Ringe des tetrazyklischen Ringsystems.

Es besitzt eine intensiv orange-rote Färbung und absorbiert sowohl im UV- (254 nm) als auch im sichtbaren (480 nm) Wellenlängenbereich. Aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit sollte es im Dunkeln aufbewahrt werden. Wegen seiner polyaromatischen Struktur weist Daunorubicin außerdem eine starke Fluoreszenz auf (Anregung: 480 nm, Emission: 560 nm) (Fogli *et al.* 1999).

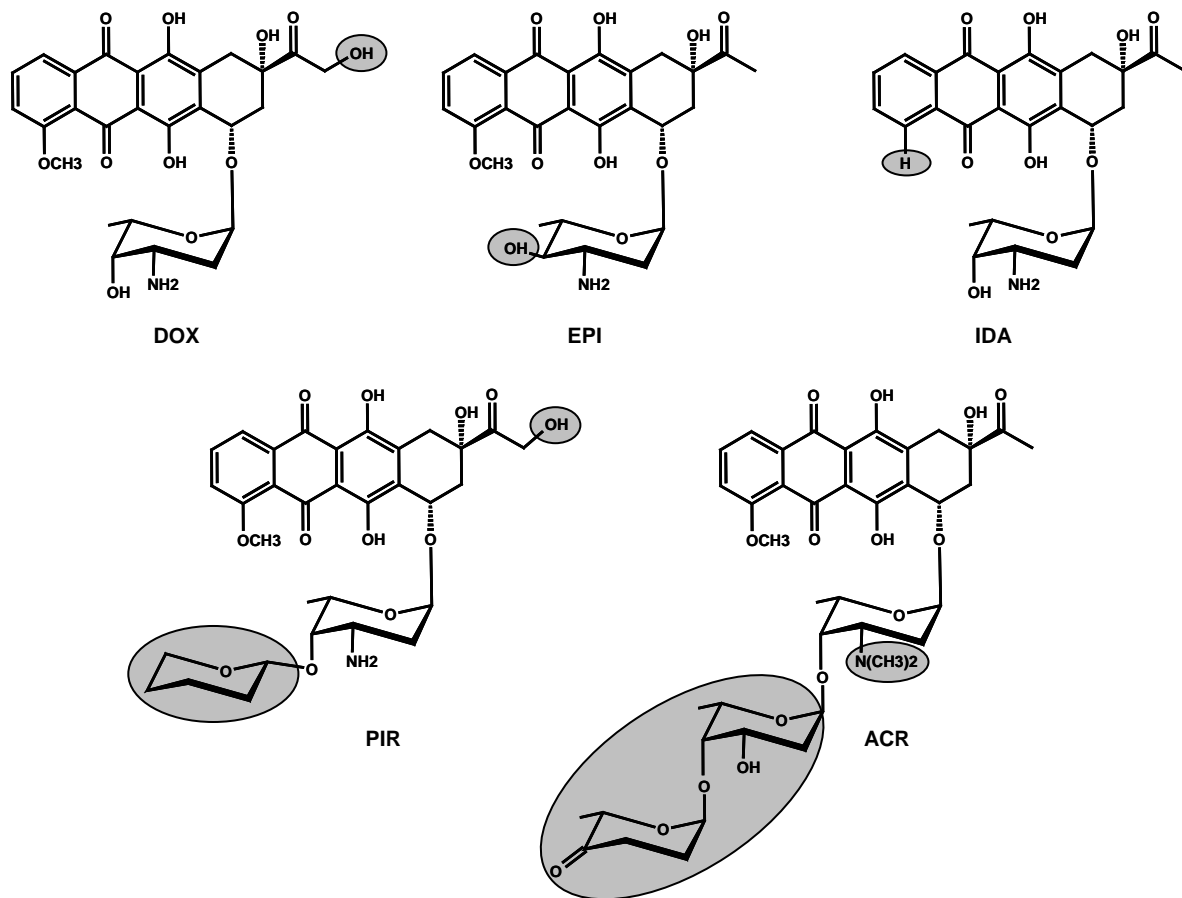
### 1.2.1 Therapeutische Anwendung und Wirkung

Daunorubicin gehört zu den am weitesten verbreiteten Chemotherapeutika in der Krebstherapie, vornehmlich wird es bei akuter myeloischer und lymphatischer Leukämie eingesetzt. Daunorubicin selbst ist kanzerogen, mutagen und embryotoxisch, was zu weitreichenden Nebenwirkungen führt. Prinzipiell wirkt Daunorubicin in allen Geweben, die eine hohe Wachstums- bzw. Zellteilungsrate haben (Schleimhäute, Haare, Blutbildung, Knochenmark). Knochenmarks suppression und Schleimhautentzündung sind daher häufige Nebenwirkungen. Ebenfalls treten Übelkeit, Appetitverlust, Haarausfall und eine Schädigung der Nierenzellen auf (Rahman *et al.* 1984). Ein besonderes Problem

stellt die dosisabhängige, kumulative Kardiotoxizität dar, die in eine akute („Soforttyp“) und eine chronische („Spättyp“) Form untergliedert wird. Im fortgeschrittenen Stadium kann dies zu Herzversagen führen und endet häufig tödlich (Possinger *et al.* 1980; Possinger *et al.* 1991; Boven *et al.* 1996).

Die Wirkung des Anthracyclins ist in der S- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus am stärksten ausgeprägt (Bartels 2002) und beruht auf einer Vielzahl an Mechanismen. Dazu zählen die Interkalation in die DNA sowie die Hemmung der Topoisomerase II, die durch Bindung des Anthracyclins an den ternären Enzym/DNA-Komplex (Froelich-Ammon & Osheroff 1995) in Anwesenheit von gebundenem ATP (Wang *et al.* 2001) geschieht. Des Weiteren kann der Chinon-Ring des Anthracyclins reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) bilden, entweder durch Ein-Elektron-Reduktion mittels flavinhaltiger Reduktasen (Olson & Mushlin 1990; Frishman *et al.* 1996; Ravid *et al.* 1999; Minotti *et al.* 2000) oder nicht enzymatisch in Anwesenheit von Eisenionen (Fenton-Reaktion) (Fenton 1876; Myers 1998). Diese ROS führen zu oxidativem Stress in der Zelle und verursachen DNA-Strangbrüche. Aufgrund der Tatsache, dass Daunorubicin den DNA/Topoisomerase II-Komplex inaktiviert, wird die DNA-Religation der geschädigten Stränge verhindert und es kommt zur Anhäufung von Doppelstrangbrüchen. Die Bildung von Sauerstoffradikalen führt zudem zu einer Vielzahl weiterer Schäden in der Zelle, die DNA, Proteine und Lipide betreffen (Kovacic & Osuna 2000). Solche Schädigungen können, abhängig vom Grad der Schädigung und vom Zelltyp, zur erhöhten Expression des Tumorsuppressorproteins p53, zu einem Wachstumsstopp oder zur Apoptose führen (Jabs 1999; Davis *et al.* 2001; Kemp *et al.* 2001). Außerdem bewirkt Daunorubicin die Inhibition der Helikase und eine Veränderung der Membranstruktur und -funktion. Auch eine kovalente Bindung an DNA wird beschrieben (Cullinane & Phillips 1990; Cullinane *et al.* 1994a; Cullinane & Phillips 1994; Cullinane *et al.* 1994b; Cutts & Phillips 1995; Cutts *et al.* 1996; Taatjes *et al.* 1997a; Taatjes *et al.* 1997b; Luce *et al.* 1999; Cutts *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2005). Dabei werden in Redoxsystemen wie beispielsweise DTT/Fe<sup>3+</sup>, Xanthin-Oxidase/NADH/Fe<sup>3+</sup> oder Glutathion/Fe<sup>3+</sup> DNA-Anthracyclin-Addukte gebildet, die über eine Methylen-Brücke zwischen der 3'-Aminogruppe des Daunosamin-Zuckers und der 2-Aminogruppe von Desoxyguanosin verbunden sind (Taatjes *et al.* 1997a). Die Methylen-Brücken entstehen aus der Reaktion von DNA und interkaliertem Anthracyclin mit *in situ* gebildetem Formaldehyd über eine Schiffsche Base (Taatjes *et al.* 1997b). Addukte werden sowohl mit dsDNA als auch mit ssDNA gebildet, wobei für ssDNA eine längere Reaktionszeit nötig ist (Cullinane *et al.* 1994a, b).

Neben Daunorubicin werden vor allem die Anthracycline Doxorubicin (Adriamycin, DOX), bei dem im Vergleich zu Daunorubicin ein Wasserstoffatom am C-14 durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist, aber auch neuere Anthracycline wie 4'-Epidoxorubicin (Epirubicin, EPI), 4-Demethoxydaunorubicin (Idarubicin, IDA), Tetrahydropyanyldoxorubicin (Pirarubicin, PIR) und Aclacinomycin A (Aclarubicin, ACR) für therapeutische Zwecke eingesetzt (Lothstein *et al.* 2001) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Therapeutische Anthracycline.** DOX: Doxorubicin, EPI: Epirubicin, IDA: Idarubicin, PIR: Pirarubicin, ACR: Aclarubicin. Die sich von Daunorubicin unterscheidenden Gruppen sind grau unterlegt.

Für den therapeutischen Einsatz gilt allgemein eine Dosierung von 10 - 60 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (Dorr *et al.* 1994). Bei der Behandlung von akuter myeloischer Leukämie wird Daunorubicin, das hier meist in Kombination mit Cytosinarabinosid eingesetzt wird, beispielsweise über drei Tage hinweg intravenös in einer täglichen Dosis von 45 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verabreicht (Zimmermann 2006). Zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie bei Kindern und Jugendlichen werden zur Erstbehandlung 36 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche pro Einzeldosis als 4 bis 24-stündige intravenöse Infusion appliziert. Dabei wird eine Einzeldosis am Tag gegeben und die Prozedur alle acht Tage insgesamt vier mal wiederholt. Daunorubicin wird hier ebenfalls in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt. Auch Doxorubicin wird in Kombinationstherapie verabreicht, wobei die kumulative Summendosis unter 550 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche gehalten wird (Wiese 2001). In Zellkultur wurde eine vollständige Wachstumsinhibition von MCF-7-Zellen (humane Brust-Adenokarzinom-Zellen) bei einer Konzentration von 1 µM Doxorubicin nachgewiesen (Wiese 2001).

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Injektion werden 5 – 15 % des Daunorubicins unverändert wieder ausgeschieden (Weenen *et al.* 1983; Dorr *et al.* 1994). Insgesamt erfolgt die Exkretion zu 37 % unverändert, zu 30 % als Daunorubicinol, dem ebenfalls zytostatisch wirkenden Hauptmetaboliten von

Daunorubicin, der durch Reduktion der C-13-Ketogruppe zum entsprechenden Alkohol entsteht, und zu 33 % in Form anderer Metabolite (Rahman *et al.* 1984).

Der zelluläre Einstrom der nicht ionisierten Anthracycline geschieht durch passive Diffusion, der Ausstrom durch Diffusion oder aktiv unter ATP-Verbrauch durch p170-Glykoproteine. Bei diesen *MDR1*-Genprodukten, die zu den ABC (*ATP binding cassette*)-Transportern zählen, handelt es sich um Transmembranproteine, die spezifische Substrate aktiv über die Zellmembran transportieren. Bei dem in der Krebstherapie häufig auftretenden MDR (*multidrug resistance*)-Phänotyp ist das p170-Glykoprotein überexprimiert, was zu einem erhöhten Daunorubicin-Ausstrom und einer verminderten Akkumulation in der Zelle führt, wodurch die Anthracyclin-Wirksamkeit reduziert wird. Sowohl die Struktur als auch die cytotoxischen Funktionen der Anthracycline begünstigen dabei die Resistenzentwicklung. Die mäßige Lipophilie und die positive Nettoladung bei physiologischem pH-Wert machen Daunorubicin zu einem guten Substrat für P-Glykoproteine. Neben dem *multidrug resistance*-Phänotyp wurden weitere Resistenzmechanismen identifiziert, z. B. MRP (*multidrug resistance associated protein*)-vermittelte Efflux-Prozesse (Bosch & Croop 1996; Lehne 2000; Renes *et al.* 2000) und Veränderungen im Gluthation-Stoffwechsel (Lothstein *et al.* 2001).

Um in Zukunft die Probleme der unerwünschten Nebenwirkungen durch Anthracycline in der Krebstherapie zu reduzieren, wurde von Bagalkot *et al.* kürzlich eine neuartige Strategie zur zellspezifischen Aufnahme von Doxorubicin durch Tumorzellen beschrieben (Bagalkot *et al.* 2006). Dabei wurde ein PSMA-spezifisches RNA-Aptamer verwendet, in das Doxorubicin interkaliert war. Da PSMA ausschließlich auf der Oberfläche von Prostatakrebszellen exprimiert wird, konnte dieser Aptamer-Doxorubicin-Komplex („*trojan aptamer*“) spezifisch an PSMA-exprimierende Zellen binden, was zur Aufnahme und intrazellulären Freisetzung des Doxorubicins und in dessen Folge zu einem reduzierten Wachstum der Zellen führte.

## 1.2.2 Struktur der nichtkovalenten Wechselwirkung von Daunorubicin mit DNA

Die Interkalation von Daunorubicin ist intensiv über NMR, Röntgenkristallographie und *molecular dynamics*-Simulationen untersucht worden (Patel *et al.* 1981a; Patel *et al.* 1981b; Tran-Dinh *et al.* 1984; Chen *et al.* 1985; Moore *et al.* 1989; Leonard *et al.* 1993; Trieb *et al.* 2004). Mit dem Komplex aus Daunorubicin und dem Oligomer d(CGTACG) wurde dabei die erste Kristallstruktur für einen Komplex aus einem Monointerkalator mit einem Oligonukleotid beschrieben (Wang *et al.* 1987). Daunorubicin bindet demzufolge mit seiner Längsachse beinahe senkrecht zur Längsachse der an der Interkalationsstelle angrenzenden Basenpaare. Der Daunomycin-Aminozucker Daunosamin, der an den Ring A des Anthracyclin-Ringsystems gekoppelt ist, liegt in der kleinen Furche, während Ring D, der eine Methoxygruppe trägt, in die große Furche ragt. Der Daunorubicin-Kern, die Ringe B und C, liegen zwischen den Basenpaaren. In das untersuchte Hexamer interkalieren zwei Daunorubicin-Moleküle und zwar an jeder der beiden C:G-Stellen an den beiden Enden der Duplex. Die Konformationen von Ring A und des Aminozuckers von Daunorubicin ändern sich bei der Interkalation relativ zum ungebundenen Molekül, wodurch der feste Sitz des Moleküls in der rechtsgängigen

kleinen Furche erleichtert wird. Über DNase I-Footprinting-Experimente mit dem 160 bp langen *tyr T*-DNA-Fragment wurden die Enden der Tripletsequenzen 5'-ATGC und 5'-ATCG als bevorzugte Bindungsstellen von Daunorubicin identifiziert (Chaires *et al.* 1990), wobei die Sequenz 5'-ATCG mit der über theoretische Studien vorhergesagten Spezifität (Chen *et al.* 1985) und zahlreichen anderen experimentellen Daten (Moore *et al.* 1989; Leonard *et al.* 1993) übereinstimmt. Da Daunorubicin möglicherweise auch mit Telomer-DNA wechselwirkt (Elmore *et al.* 2002), indem es die Quadruplex durch das Anthrachinon-Chromophor stabilisiert, wurde die Struktur von Daunorubicin und einer G-Quadruplex über Röntgenkristallographie untersucht (Clark *et al.* 2003). Die Kristallstruktur zeigte, dass drei in einer Ebene liegende Daunorubicin-Moleküle mit dem 5'-Ende der parallelen Quadruplex aus vier d(TGGGT)-Strängen wechselwirken, wobei die Daunosamin-Zucker-Reste Wasserstoff und/oder van-der-Waals-Wechselwirkungen mit drei der vier Quadruplex-Furchen ausbilden. Die große Oberfläche der endständigen G-Quartette bietet demnach eine gute Angriffsfläche für die gleichzeitige Bindung dreier Daunorubicin-Moleküle, so dass eine Stapelung (*stacking*) gegenüber der Interkalation zwischen den Ebenen der Quadruplex vorgezogen wird. Diese Struktur geht einher mit Modellen aus NMR-Studien (Fedoroff *et al.* 1998; Gavathiotis *et al.* 2001), wobei weitere Daten nötig sind, um dieses Bindungsmodell zu manifestieren (Clark *et al.* 2003).

### 1.2.3 Detektion von Daunorubicin in Umwelt und Patientenproben

Da Daunorubicin in großem Umfang für therapeutische Zwecke eingesetzt und zu einem relativ hohen Anteil (Rahman *et al.* 1984) unmetabolisiert über den Urin wieder ausgeschieden wird, gelangt es ins Abwasser. Über dieses kann es Kläranlagen erreichen, wo es aufgrund seines antibiotischen Effekts die dort zur Abwasserreinigung vorhandenen Mikroorganismen schädigen kann. Wird Daunorubicin hier nicht abgebaut oder eliminiert, kann es möglicherweise sowohl Trinkwasser als auch den Erdboden kontaminieren (Mahnik *et al.* 2007). Modellberechnungen für die Universitätsklinik Wien ergaben, dass im Abwasser der onkologischen Abteilung mit Konzentrationen im unteren µg/l-Bereich zu rechnen ist (Fürhacker *et al.* 2006). Tatsächliche Messungen ergaben für Daunorubicin einen Wert von 0,29 µg/l, für Doxorubicin 0,26-1,35 µg/l (Mahnik *et al.* 2007).

Die Daunorubicin-Konzentrationen bei verschiedenen Patienten schwanken, da die Pharmakokinetik von Anthracyclinen – und demnach ihre Wirksamkeit – von Patient zu Patient stark variiert (Wade *et al.* 1992; Schleyer *et al.* 1996). In Anbetracht der starken Nebenwirkungen sollte die tatsächliche Konzentration der Medikamente so niedrig wie möglich gehalten werden. Zur Optimierung der Behandlung wäre deshalb ein therapeutisches *drug monitoring* von großer Bedeutung (Fogli *et al.* 1999).

Eine Reihe von klassischen analytischen Methoden wie Spektrometrie (Sastry & Rao 1996), Flüssigchromatographie (van Asperen *et al.* 1998; Fogli *et al.* 1999; Lachatre *et al.* 2000) und Kapillarelektrophorese (Reinhoud *et al.* 1992; Simeon *et al.* 1999; Perez-Ruiz *et al.* 2001) wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung von Daunorubicin in Patientenproben beschrieben. Dabei lagen die Empfindlichkeiten im niedrigen nanomolaren Bereich für Flüssigchromatographie und



Kapillarelektrophorese bzw. im unteren mikromolaren Bereich für UV-Vis-Spektrometrie. Abwasseranalysen wurden mittels HPLC analysiert (Mahnik *et al.* 2007). Für jede der Methoden ist ein hohes Maß an Instrumentierung sowie eine qualifizierte Handhabung nötig.