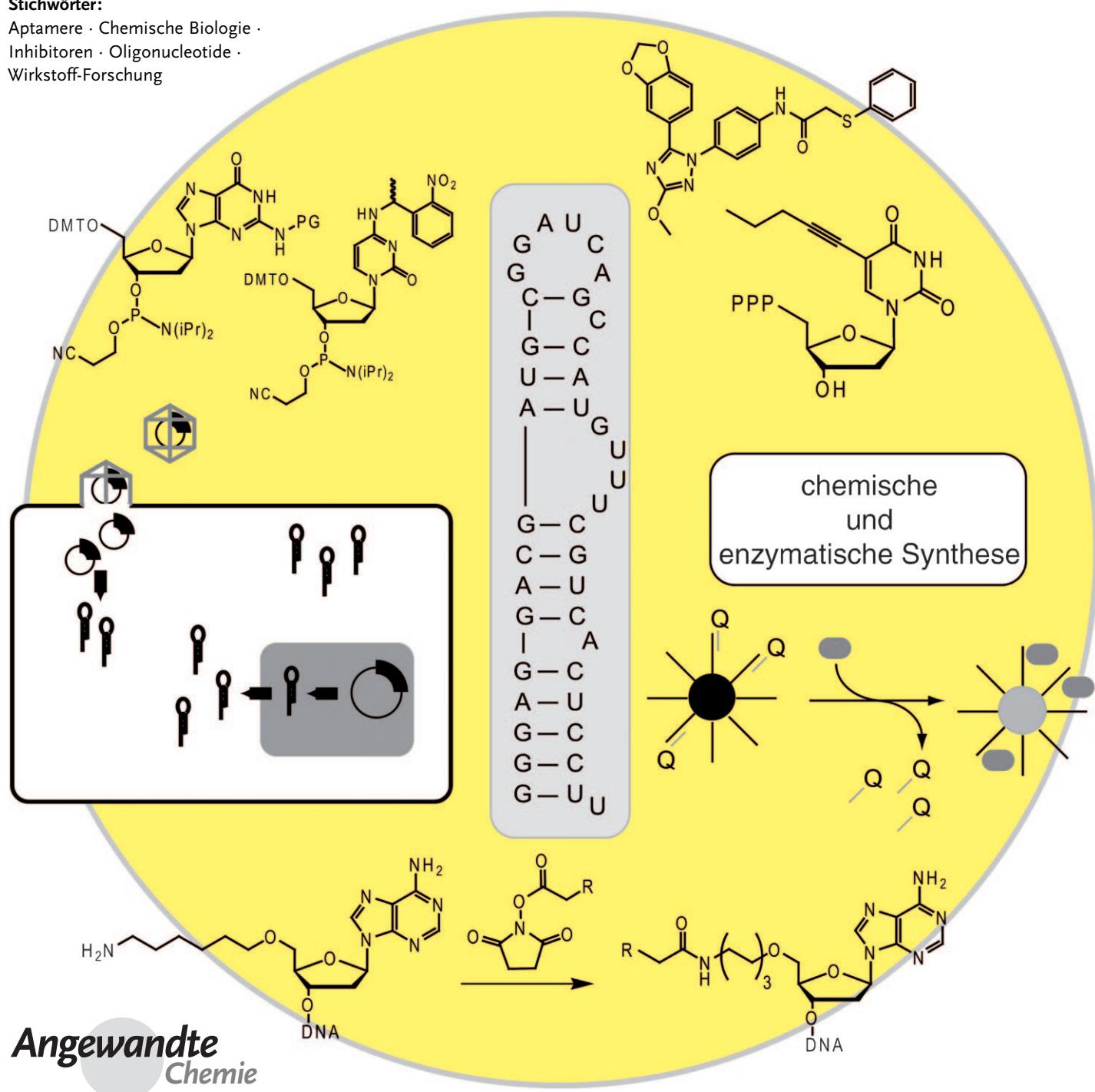


Die chemische Biologie von Aptameren

Günter Mayer*

Stichwörter:

Aptamere · Chemische Biologie ·
Inhibitoren · Oligonukleotide ·
Wirkstoff-Forschung



Aptamere sind kurze einzelsträngige Nucleinsäuren mit einer klar definierten dreidimensionalen Faltung. Sie zeigen eine hohe Affinität und Spezifität für ihre Zielstrukturen und inhibieren deren biologische Funktionen. Aptamere gehören zur Stoffklasse der Nucleinsäuren und können entweder chemisch, enzymatisch oder durch Kombination beider Methoden hergestellt werden. Daher können Aptamere sowohl als chemische wie auch als biologische Substanzen eingeordnet werden. Etablierte Methoden ebenso wie neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Aptamere sollen in diesem Aufsatz zusammengefasst werden. Die Verwendung von Aptameren in der chemischen Biologie wird diskutiert.

1. Einführung

In den 1960er Jahren beschrieben Spiegelman et al. die ersten Evolutionsexperimente mit Nucleinsäuren.^[1–4] Ihre Arbeiten beruhten auf der RNA-abhängigen RNA-Replikase für die Replikation bestimmter RNA-Spezies. Später hatte die 1986 von Mullis et al. entdeckte Polymerasenkettreaktion (PCR) einen großen Einfluss auf die Molekularbiologie im Allgemeinen und Evolutionsexperimente im Besonderen.^[5–9] Gerade vier Jahre nach der Beschreibung der PCR wurde die systematische Identifizierung von Nucleinsäuren mit definierten Eigenschaften durch In-vitro-Selektionstechniken, auch SELEX (Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification) genannt, vorgestellt. Die PCR-Methode ermöglicht in vitro die spezifische Vervielfältigung von jeglichen einzel- oder doppelsträngigen DNA-Templaten unter Verwendung von komplementären Primern, Desoxy-nucleotiden und hitzestabilen DNA-Polymerasen.^[1,10] Durch diese Technik lässt sich prinzipiell jede Nucleinsäure, unabhängig von ihrer Länge und Sequenz, amplifizieren.

Drei Arbeitsgruppen gelang 1990 unabhängig voneinander die Isolierung von kurzen Nucleinsäuren, die durch einen definierten Versuchsaufbau festgelegte Eigenschaften aufwiesen: Ellington und Szostak berichteten von RNA-Molekülen, die an einen kleinen organischen Farbstoff binden. Sie nannten diese RNAs Aptamere – eine Wortchimäre aus dem lateinischen Ausdruck „*aptus*“ (passen) und dem griechischen Wort „*meros*“ (Teil).^[11] Ein zweiter Artikel von Tuerk und Gold beschrieb den Prozess der Selektion von Bakteriophage-T4-DNA-Polymerase bindenden RNA-Molekülen. Diesen Prozess bezeichneten sie als SELEX.^[12] Robertson und Joyce schilderten die Anwendung der In-vitro-Selektion zur Anpassung der Gruppe-I-Ribozym-Spaltungsreaktion an DNA anstatt einzelsträngiger RNA.^[13] Diese wegweisenden Arbeiten zeigten schon damals das enorme Potenzial der In-vitro-Selektion zur Isolierung von Nucleinsäuren mit ausgeklügelten Eigenschaften.

Es folgten verschiedenste Studien, die eindeutig die Erwartungen an die Aptamertechnik bestätigten, dass Nucleinsäuren außer als reine Blaupause des genetischen Codes oder als starres Material für Nanoarchitekturen^[14–20] auch als anspruchsvolle funktionelle Einheiten fungieren können. Ein weiterer Beweis für die Vielfältigkeit von Nucleinsäuren

Aus dem Inhalt

1. Einführung	2711
2. Aptamere – biologische und chemische Substanzen	2713
3. Aptamere zur Identifizierung von Biomolekülen	2718
4. Aptamere für die Zielstrukturvalidierung	2719
5. Wirkstoffentwicklung mithilfe von Aptameren	2721
6. Aptamere als Wirkstoffe	2721
7. Zusammenfassung und Ausblick	2723

gelang durch die Entdeckung von kleinen, nichtkodierenden RNA-Molekülen und RNA-Schaltern, die Schlüsselrollen als Regulationselemente bei der Genexpression in Bakterien, Eukaryoten und höheren Organismen spielen.^[21–23] Besonders RNA-Schalter zeigen, dass die Natur schon seit langem Aptamerdomänen nutzt, um eine hoch affine und spezifische Bindung kleiner Metaboliten sicherzustellen.^[24–26] Nucleinsäuresequenzen haben eine definierte Funktion, die sich aus ihrer dreidimensionalen Faltung ergibt, und enthalten den Bauplan für ihre Synthese in ihrer eigenen Primärsequenz. Durch chemische Synthese kann ein Aptamer mit einer Vielzahl von zusätzlichen funktionellen Gruppen ausgestattet werden und lässt sich so für jede Anwendung anpassen. Kombinatorische Festphasensynthese liefert die randomisierte Startbibliothek, anschließend folgt ein von enzymatischen Methoden geprägter In-vitro-Selektionsprozess, und zum Schluss kann jedes gefundene Aptamer durch chemische Synthese weitermodifiziert werden (Abbildung 1).

Die frühen Selektionsverfahren für Proteine waren mühsam, und es dauerte oft mehrere Monate, bis spezifische Aptamere für das gewünschte Protein identifiziert wurden. Heutzutage hat sich der Selektionsprozess dank ausgefeilter Methoden, die unter anderem Affinitätspartikel,^[27] Kapillarelektrophorese,^[28–32] Oberflächenplasmonenresonanz,^[33,34] HPLC^[35] und automatisierte Prozesse^[36–38] nutzen, auf wenige Tage verkürzt. Diese hoch entwickelten Selektionsprozesse sind ebenfalls den sehr gut replizierbaren Nucleinsäure-

[*] Dr. G. Mayer

Life and Medical Sciences,
Prog. Unit Chemical Biology and Medicinal Chemistry
Universität Bonn
c/o Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie,
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-734809
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de

bibliotheken zu verdanken, die kaum Artefakte, z.B. molekulare Parasiten (DNA-Sequenzen mit hervorragenden Replikationseigenschaften – meist kürzer oder länger als die DNA-Bibliothek), akkumulieren. Die Verwendung automatisierter Arbeitsstationen setzt eine Immobilisierung des Zielmoleküls an magnetischen Partikeln^[37,39] voraus. Entsprechende Verfahren sind so optimiert, dass keine Reinigung von Nucleinsäureintermediaten notwendig ist, was eine simultane Selektion von Aptameren gegen bis zu acht Zielmoleküle ermöglicht. Für In-vitro-Selektionen wurden außer linearen Nucleinsäurebibliotheken (Abbildung 1B) auch strukturell eingeschränkte Bibliotheken mit definierten Sekundärstrukturelementen eingesetzt.^[39,40] Diese Bibliotheken haben den Vorteil, dass eine Verkürzung und Strukturbestimmung eines repräsentativen Aptamers unkompliziert ist.^[41] Eine effiziente Kombination von chemischer Synthese mit Selektionsprozessen wurde kürzlich von Bugaut et al. demonstriert.^[42] Sie synthetisierten eine Bibliothek mit 2'-Amino-2'-desoxyuridin, die an 14 Positionen randomisiert war. Vor der Inkubation mit dem Zielmolekül wurde diese Bibliothek posttranskriptional mit einer Mischung aus drei Aldehyden modifiziert (Schema 1). Nach der Inkubation und dem Eluieren der gebundenen RNA-Moleküle wurden die Aldehyde abgespalten, um die enzymatische Replikation und Amplifikation der isolierten RNA zu ermöglichen.

Der wohl größte Nachteil der SELEX-Methode ist die schlechte Vorhersagbarkeit des Selektionserfolges. Während die Parameter des Aptamers selbst, wie Affinität und Spezifität, im Verlauf der Selektion verfolgt werden können, ist es a priori nicht möglich, die Fähigkeit des Zielmoleküls zur Aptamerbindung zu beurteilen. Bei Proteinen kann der isoelektrische Punkt (pI) einen Hinweis darauf geben, ob sich das Zielmolekül für SELEX eignet oder nicht. Im Allgemeinen sind Proteine, die unter physiologischen Bedingungen (pH 7.0–7.4) positiv geladen sind, exzellente Zielmoleküle. Ein pI < 7 deutet aber keineswegs unbedingt an, dass für das Zielprotein keine Aptamere angereichert werden können, denn in zahlreichen Veröffentlichungen wurde die erfolgreiche Selektion von Aptameren für Proteine mit einem pI < 7 beschrieben. Diese Beispiele zeigen, dass der pI-Wert allein kein verlässliches Kriterium für die Bewertung eines geeigneten Zielproteins für eine SELEX ist. Vor allem unter den Selektionsbedingungen kann die Instabilität der Zielprote-

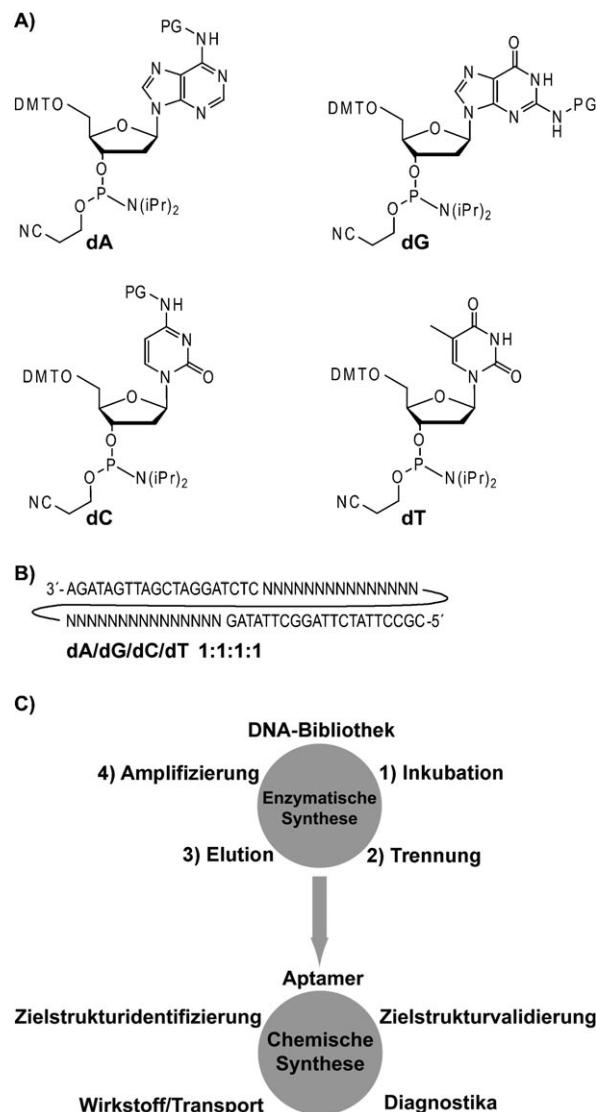


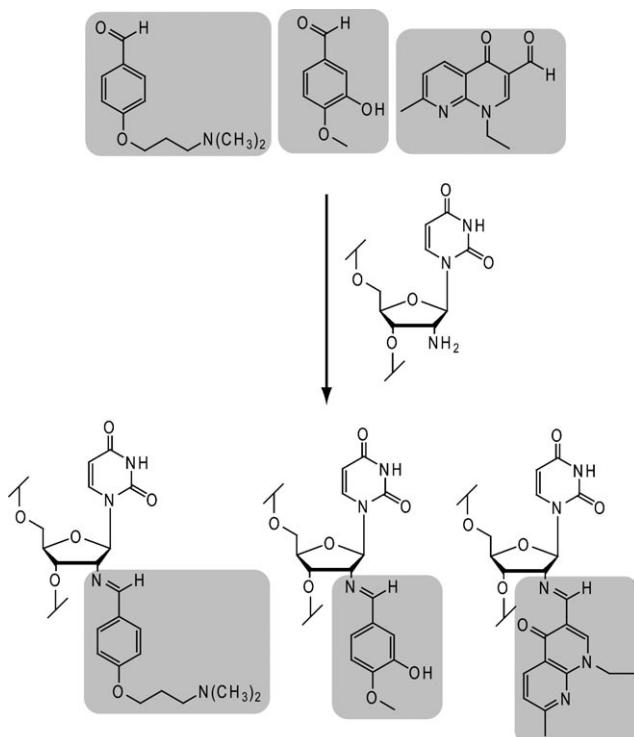
Abbildung 1. A) Dimethoxytrityl(DMT)-geschützte Desoxynucleosid-Phosphoramidite für die Festphasensynthese von DNA (PG: Schutzgruppe). B) Nucleinsäurebibliotheken können durch definierte Primer-Bindungsstellen, die randomisierte Bereiche (N) flankieren, synthetisiert werden. C) Enzymatische Methoden sind unerlässlich für den In-vitro-Selektionsprozess (oberer Kreis), der aus vier Schlüsselschritten besteht: Inkubation der Nucleinsäurebibliothek (DNA-Bibliothek) mit ausgewähltem Zielmolekül, Trennung gebundener von ungebundenen Nucleinsäuren, Elution der gebundenen Nucleinsäuren und Vervielfältigung der eluierten Nucleinsäuren. Ist ein Aptamer identifiziert, kann es für verschiedene Anwendungen angepasst werden (unterer Kreis), z. B. zur Charakterisierung, Validierung und Identifizierung von Zielstrukturen sowie für die Diagnostik.

inkonformation zum ernsthaften Problem werden. Da Aptamere nur eine bestimmte dreidimensionale Struktur erkennen, kommt es wegen Konformationsänderungen des Proteins zum Verlust potenzieller Aptamere während der Selektion – ein Ereignis, das innerhalb von zwei aufeinander folgenden Selektionsrunden eintreten kann. Dieses Problem kann vermieden werden, indem vor jedem Selektionszyklus frisches Protein an die Affinitätsmatrix gekuppelt wird. Noch gibt es kein Vorhersagemodell, das die A-priori-Beurteilung



A black and white portrait photograph of Günter Mayer, a man with dark hair and glasses, looking directly at the camera.

Günter Mayer, geboren in München, studierte Chemie an der dortigen Ludwig-Maximilians-Universität und promovierte bei M. Famulok an der Universität Bonn mit einer Arbeit über die funktionelle Analyse von Cytosin-1 in T-Zellen mit RNA-Intrameren. 2001 übernahm er die Leitung der Abteilung für kombinatorische Biochemie des Biotech-Unternehmens NascaCell und war an der Gründung des Unternehmens NascaCell IP GmbH beteiligt. Für seine Habilitation kehrte er 2004 zur Gruppe von M. Famulok an die Universität Bonn zurück. Seine Forschungsinteressen sind die genaue Kontrolle der Aptameraktivität sowie die Entdeckung neuer Zielstrukturen auf Basis von Aptamerselektion und RNA-Schaltern.



Schema 1. 2'-Amino-2'-desoxyuridin enthaltende RNA-Bibliotheken können mit Aldehyden (graue Kästen) modifiziert werden, um so die Strukturdiversität der RNA-Bibliothek zu erhöhen.^[42]

des Selektionserfolges für ein Zielmolekül ermöglicht. Aus diesem Grund muss immer der gesamte Selektionsprozess durchlaufen werden, ehe eine Aussage über den Erfolg einer Selektion getroffen werden kann. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Selektion mit einem homogenen Zielprotein unter automatisierten Selektionsbedingungen beträgt etwa 75 %.^[244]

Die immer breitere Anwendung von Aptameren in der Grundlagenforschung und der Medizin zeigt sich daran, dass die Zahl von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet vor allem während der letzten fünf Jahre stark gestiegen ist.^[23,43-45] Eine Suche des Stichwortes „Aptamer*“ bei Web of Science lieferte 2417 publizierte Artikel und 44158 Zitierungen (Stand: 21.11.2008). Erwähnenswert ist auch das stete Wachstum der publizierten Artikel und Zitierungen pro Jahr mit einem starken Anstieg ab 2002 (Abbildung 2).

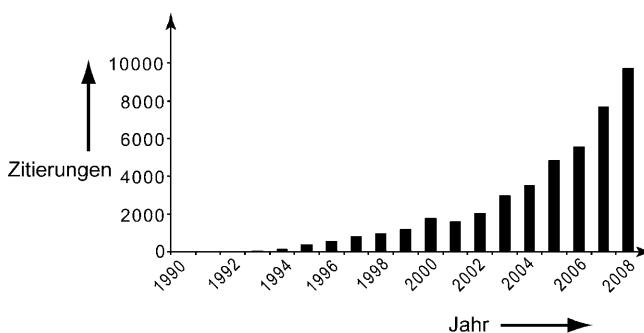


Abbildung 2. Zitierungen bei Web of Science bei der Suche mit dem Stichwort „Aptamer*“ (Stand: 21.11. 2008).

In diesem Aufsatz sollen die neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Aptamere zusammengefasst werden, wobei die chemische und enzymatische Modifizierung von Aptameren für deren Anpassung an bestimmte Anwendungen im Vordergrund stehen soll. Für den Leser soll klar werden, wie sich synthetische Aptamere zur Zielstrukturidentifizierung und als Validierungswerkzeug einsetzen lassen. Die Verwendung von Aptameren für die Diagnostik und Wirkstofffindung soll ebenso erläutert werden.^[46]

2. Aptamere – biologische und chemische Substanzen

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nucleinsäuren, die sich durch eine definierte dreidimensionale Struktur auszeichnen und dadurch eine hohe Affinität zu einem Zielmolekül zeigen. DNA- und RNA-Polymerasen sind für den In-vitro-Selektionsprozess unentbehrlich, da sie die korrekte Replikation der selektierten Sequenzen sicherstellen. Durch die Einführung von Punktmutationen erhöhen sie die Covarianz der selektierten Nucleinsäuren. Es wurden unterschiedlich modifizierte Nucleotide beschrieben, die mit den enzymatischen Schritten des Selektionsprozesses kompatibel sind. Dadurch können die chemische Diversität erhöht und die biologischen Eigenschaften der Nucleinsäurebibliotheken erweitert werden (Abbildung 3).^[47] Diese Modifizierungen wurden entweder am Phosphat/Ribose-Rückgrat oder an der Nucleobase eingeführt.^[48] Der Austausch des DNA-Phosphatrückgrats gegen ein Phosphorthioat erhöht die Stabilität gegen Nucleaseen und ermöglicht dadurch den Einsatz solcher Moleküle innerhalb der Zelle. Außer Antisense-Molekülen wie Vitavene wurden auch Aptamere mit Phosphorthioat-Rückgrat beschrieben.^[49,50] Die bedeutendste Modifizierung von Aptameren ist jedoch die Derivatisierung der 2'-Ribose. Diese Position trägt signifikant zur Stabilität von RNA-Aptameren bei, und schon häufig wurden 2'-Fluor- und 2'-Amino-2'-Desoxypyrimidinnucleotidtriphosphate für die direkte Selektion von Nuclease-stabilisierten RNA-Aptameren eingesetzt. Ellington und Chelliserrykattil entwickelten eine Variante der T7-RNA-Polymerase, die 2'-Methoxypyrimidinnucleotidtriphosphate und 2'-Methoxyadeninnucleotidtriphosphate als Substrate für die In-vitro-Transkription toleriert.^[51,52] Die Anwendbarkeit der zuletzt erwähnten Modifikation während des In-vitro-Selektionsprozesses ist jedoch eingeschränkt, da RNA-Moleküle damit nicht als Templat für die reverse Transkription infrage kommen. Der Einsatz fixierter Nucleinsäuretriphosphate (locked-nucleic acid (LNA) triphosphates) für die PCR und die In-vitro-Transkription wurde vor kurzem von Wengel und Mitarbeitern beschrieben.^[53,54] LNAs tragen eine Methylen-Ether-Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom, was dazu führt, dass LNAs ihre 3'-Kohlenstoffposition in der *endo*-Konformation „einschließen“. Dies könnte den Weg zur Konstruktion von Nucleinsäurebibliotheken mit LNA-Bausteinen für die De-novo-Selektion von LNA-Aptameren ebnen.

Modifizierte Nucleobasen, besonders C5-modifizierte Uridine und Desoxyuridine, die mit der enzymatischen Re-

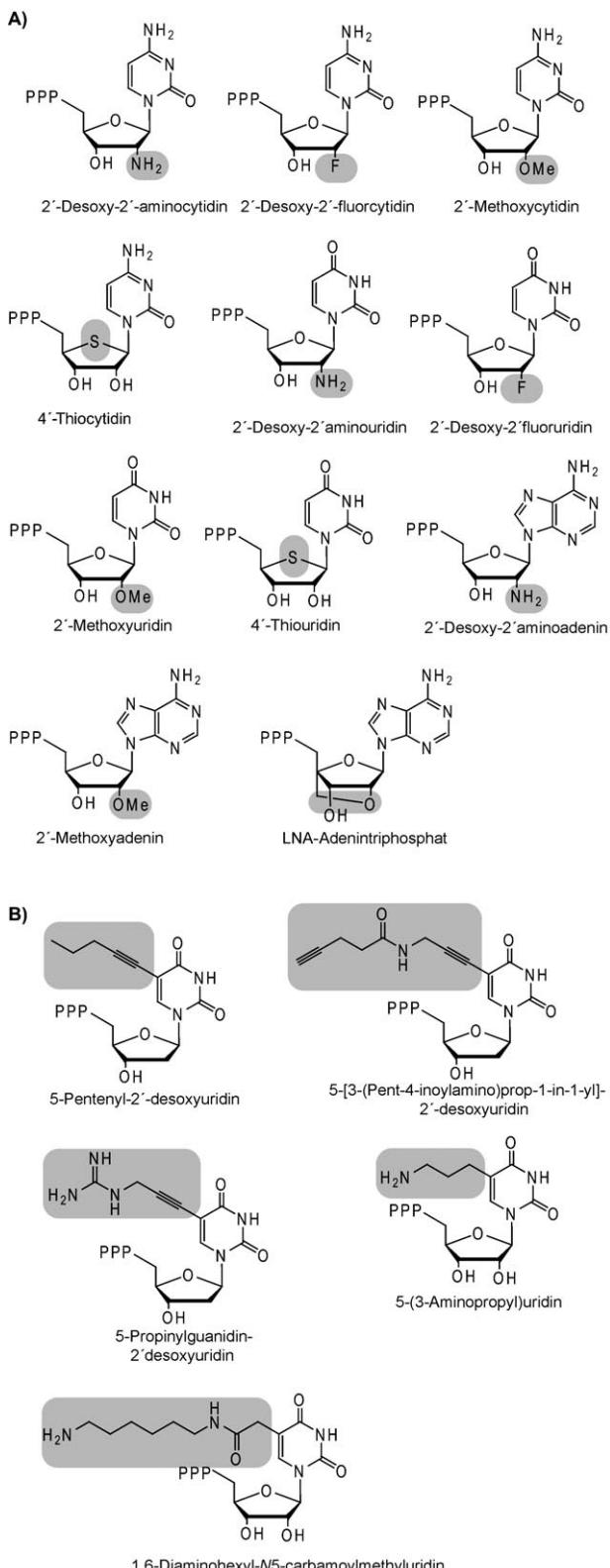
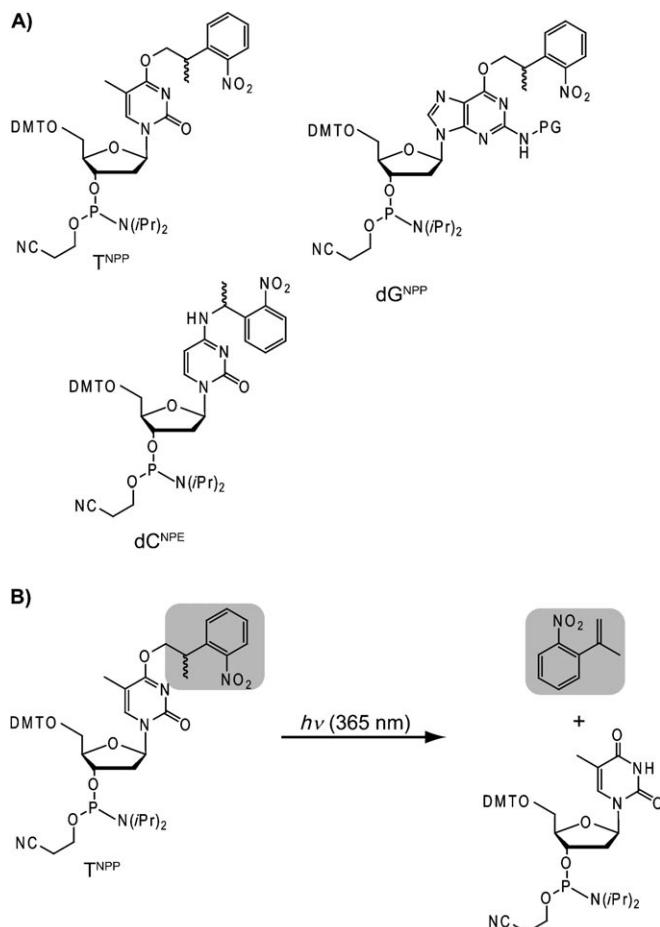


Abbildung 3. An der 2'- (A) oder der C5-Position (B) modifizierte Uriddnucleotide, die mit den enzymatischen Schritten des SELEX-Prozesses kompatibel sind (PPP = Triphosphat). Modifizierungen sind grau unterlegt.

plikation vereinbar sind, wurden ebenfalls beschrieben.^[55–57] Für die In-vitro-Selektion von modifizierten Aptameren lassen sich auf diese Weise verschiedene Funktionalitäten in Nucleinsäurebibliotheken einbringen. Ferner eröffnet die Einführung von Alkingruppen, z.B. durch die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition von Azid-derivatisierten Verbindungen, die Möglichkeit einer Modifizierung von Aptameren im Anschluss an die Selektion.^[58–61] Dadurch kann ein Aptamer mit verschiedensten Funktionalitäten ausgestattet werden, um es an individuelle Anwendungen anzupassen. Unser Labor hat lichtregulierbare Aptamere entwickelt, die nach der Selektion durch das positionsspezifische Einführen photolabiler Schutzgruppen, wie *o*-Nitrophenylpropyl (NPP) und *o*-Nitrophenylethyl (NPE), während der Festphasensynthese mit modifizierten Nucleosiden mithilfe der Phosphoramiditmethode hergestellt werden (Schema 2).^[62] Aptamere mit photolabilen Schutzgruppen eignen sich für die orts- und zeitabhängige Regulierung der Aptameraktivität und somit zur Kontrolle der Aktivität des Zielmoleküls. Dabei haben Aptamere den Vorteil, dass sie entweder lichtaktivierbar oder lichtinaktiv-

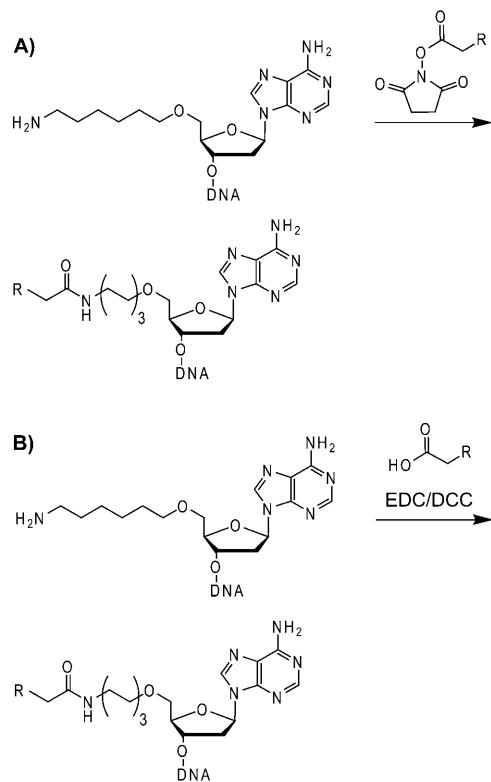


Schema 2. A) Phosphoramidite von Nucleotiden mit photolabilen Schutzgruppen an den exocyclischen Positionen O4 (TNP), O6 (dG^{NPP}) und N4 (dC^{NPE}) und für die seitenspezifische Einführung von photolabilen Schutzgruppen (NPP, NPE) in Aptamere durch Festphasensynthese (PG: Schutzgruppe). B) Die exemplarisch für TNP gezeigte Beleuchtung der modifizierten Nucleobase ($\lambda = 365$ nm) resultiert in der Abspaltung der Schutzgruppe von der nativen Nucleobase.

ierbar entworfen werden können.^[63–65] Dies ermöglicht den Zugang zu vielfältigen lichtregulierbaren Proteininhibitoren auf Aptamerbasis.

2.1. Aptamere und ihre Modifizierung für diagnostische Zwecke

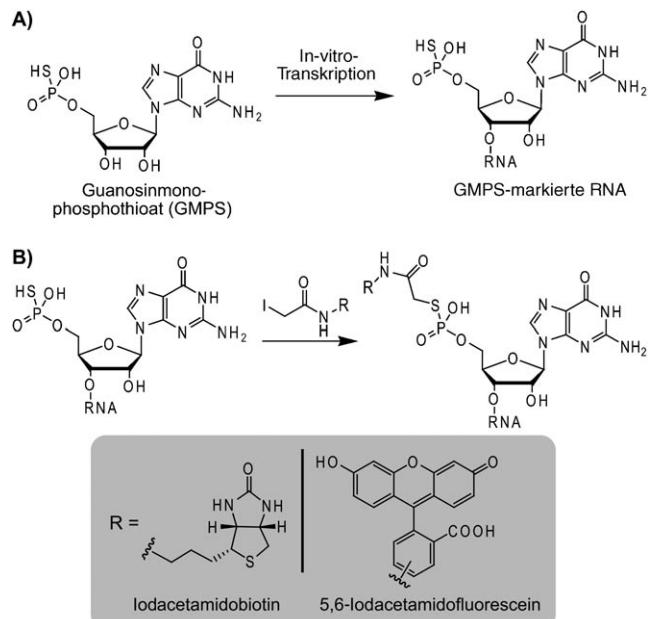
Wenn Aptamere unter bestimmten Bedingungen fluoreszieren, eignen sie sich für den Einsatz als Fluoreszenzsonden. Verschiedene Ansätze wurden beschrieben, und es gibt eine Reihe hervorragender Übersichtsartikel zu diesem Gebiet.^[66–68] Aptamere können an ihrer 5'-Position chemisch, enzymatisch oder durch eine Kombination aus beidem modifiziert werden.^[69,70] DNA-Aptamere können durch eine PCR-Amplifikation mit passenden fluoreszenzmarkierten Primer-Molekülen und nachfolgende Einzelstrangverdrängung oder direkt durch eine chemische Synthese verändert werden. Die Einführung einer 5'-Aminogruppe während der chemischen Synthese ergibt einen vielseitigen Anker, der mithilfe von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) oder Ethylendiamincarbodiimid (EDC) modifiziert werden kann. Auf diese Weise lässt sich das gewünschte fluoreszierende Molekül oder ein anderer Rest einführen (Schema 3).^[71,72]



Schema 3. Derivatisierung von 5'-Amino-modifizierten DNA-Aptameren mit NHS (A) oder EDC/DCC (B). DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid.

Fluoreszierende RNA-Aptamere können direkt durch Festphasensynthese hergestellt werden; RNA-Moleküle, deren Länge 80 Nucleotide überschreitet, sind allerdings schwer zu synthetisieren. Durch eine In-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase unter Verwendung so genannter

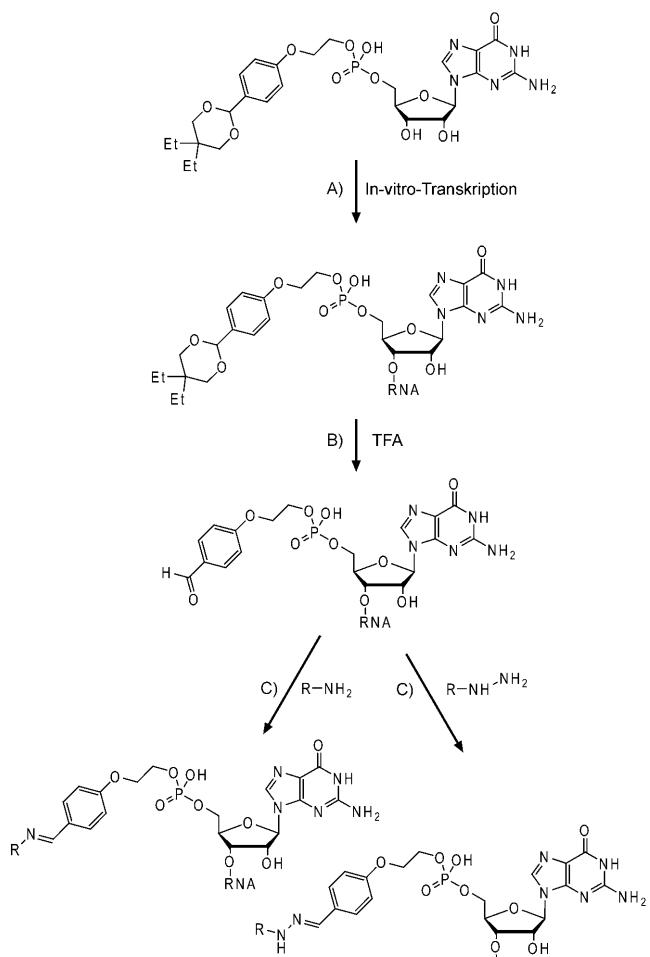
Initiatornucleotide wie Guanosinmonophosphothioat (GMPS) können alternativ Modifikationen am 5'-Ende von RNA-Molekülen enzymatisch eingeführt werden.^[69,73,74] Der Einbau von GMPS am 5'-Ende der RNA ermöglicht die Modifizierung von RNA-Molekülen mit fluoreszierenden Resten oder anderen Reportermolekülen mithilfe des Iodacetamidoverfahrens (Schema 4).^[69]



Schema 4. A) Einführung von GMPS-Resten an der 5'-Position von RNA durch In-vitro-Transkription. B) GMPS-modifizierte RNA kann durch Reaktion mit Iodacetamidogruppen weiter derivatisiert werden. Dabei lassen sich entweder Biotin oder fluoreszierende Gruppen (grauer Kasten) einführen.

Unlängst entwickelten Jäschke et al. ein Initiatornucleotid, mit dem Aldehydmodifikationen am 5'-Ende der enzymatisch synthetisierten RNA eingeführt werden können. Diese können wiederum mit Amino- oder Hydrazin-funktionalisierten Gruppen derivatisiert werden (Schema 5).^[75] Dadurch lässt sich das Spektrum von möglichen Modifikationen erweitern, die durch eine Kombination von chemischen und enzymatischen Verfahren zugänglich sind. Außerdem 5'-Ende kann auch das 3'-Ende von RNA-Molekülen effizient modifiziert werden. Ein Weg führt über Redoxreaktionen und Umsetzungen mit Hydraziden oder Semithiocarbaziden zur Einführung funktioneller Reste am 3'-Ende von RNA-Molekülen (Schema 6).^[76]

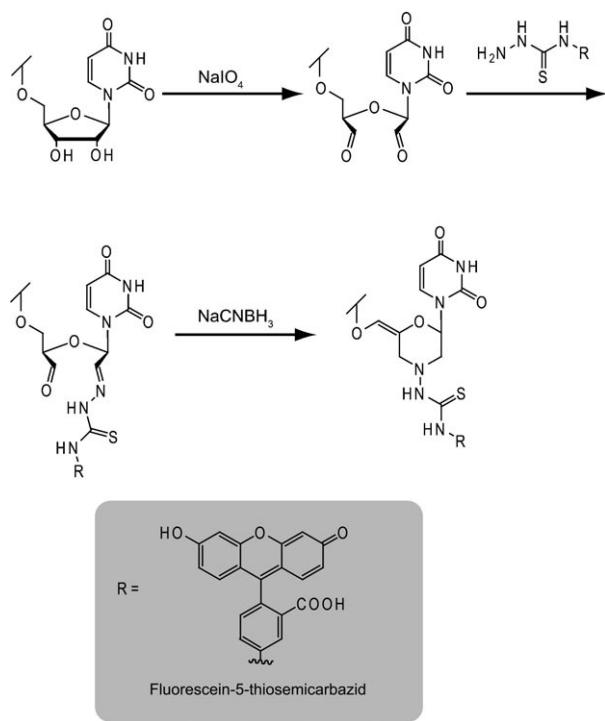
Eine Modifizierung im Anschluss an die Selektion kann allerdings die Aptameraktivität verringern, was ihren Nutzen für diagnostische Zwecke einschränkt. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man Aptamere verwendet, die durch Bindung an ein kleines Molekül dessen Fluoreszenz verändern, wie für Malachitgrün beschrieben.^[77–82] Die Kombination solcher Reporterpaptamere mit anderen funktionellen Nucleinsäure-Untereinheiten könnte den Weg zu hoch entwickelten Diagnosewerkzeugen ebnen. Es gibt mehrere exzellente Übersichtsartikel zu Aptamer-basierten



Schema 5. A) Das Acetal-geschützte Aldehydguanosinphosphat kann während der In-vitro-Transkription am 5'-Ende der RNA eingeführt werden. B) Entschützen des Acetals durch Trifluoressigsäure (TFA) ergibt den entsprechenden Aldehyd, der schließlich mit Amino- oder Hydrazid-derivatisierten funktionellen Resten R modifiziert werden kann (C).

elektronischen Sensoren und Mikro-Arrays.^[83–92] Gold und Mitarbeiter führten den Photo-SELEX-Ansatz ein, der die photochemische Vernetzung eines Aptamers mit einem Zielprotein über eingebaute 5-Bromdesoxyuridinnukleotide ermöglicht. Beim Einsatz lichtempfindlicher Aptamere als Erkennungselemente in Mikro-Arrays führt dies zu einem wesentlich besseren Signal/Rausch-Verhältnis.^[93] Eine elegante Anwendung konformativ labiler Aptamere wurde von Li und Mitarbeitern beschrieben.^[94,95] Die adaptive Bindung der Aptamere an ihre Zielmoleküle führt zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität.^[96,97]

Ähnlich wie Antikörper wurden modifizierte Aptamere in verschiedensten Analyseverfahren, darunter ELISA-ähnliche Formate,^[98,99] Western-Blot-Analyse,^[100] Kapillarelektrophorese,^[30,101] Durchflussscytometrie,^[102] In-vivo-Imaging,^[103] HPLC^[35,104] und Mikro-Arrays,^[93,105] eingesetzt, um Biomoleküle mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren. Eine ausgelüpfte Entwicklung im Bereich der Aptamerdiagnostik setzt auf Aptamere als Erkennungselemente und als

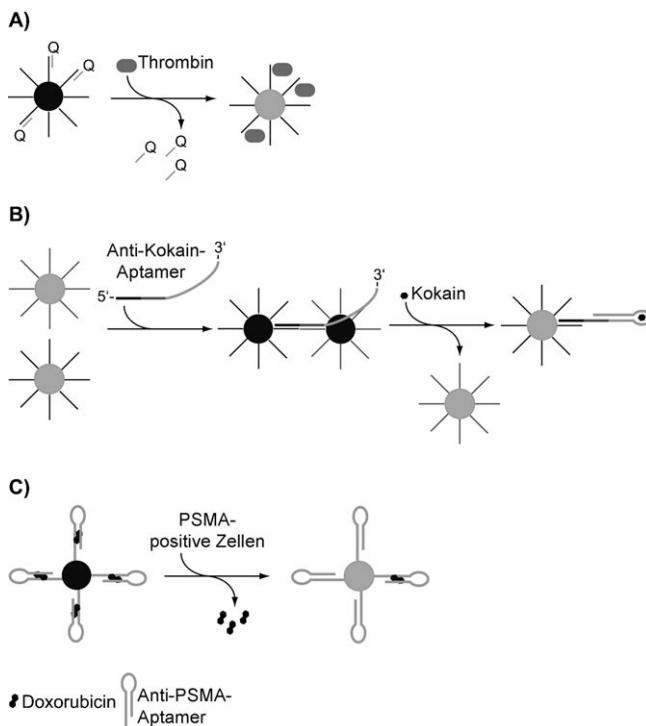


Schema 6. Modifizierung des 3'-Endes von RNA durch Oxidation mit Natriumperiodat und Kondensation des Aldehyds mit Thiosemicarbazid-Derivaten, wie Biotin oder Fluorescein. Ein Ringschluss ist durch Reduktion mit NaCNBH₃ möglich.

Template für Amplifikationsreaktionen, wie dem Rolling-Circle-Mechanismus^[106,107] oder der Aptameraffinitäts-PCR.^[108] Eine sehr empfindliche Detektion von Analyten in komplexen Mischungen nach Landegren und Mitarbeitern beruht auf dem Einsatz von Aptameren in Proximitäts-Ligations-basierten Assays.^[109,110] (Dabei werden Oligonukelotide aufgrund ihrer räumlichen Nähe, die z. B. durch ein Rezeptor-Liganden-Paar induziert werden kann, spezifisch miteinander verknüpft, wodurch ein Templat entsteht, das äußerst empfindlich durch PCR nachgewiesen werden kann.) Trotz aller dokumentierten Erfolge wird weder ein auf Aptameren basierendes Detektionsverfahren im klinischen Alltag eingesetzt, noch ist ein kommerzieller Test verfügbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Aptamere ihre Zielmoleküle anders als Antikörper erkennen, die bereits eine breite Anwendung im klinischen Alltag finden: Um die Affinität und Spezifität der Aptamere aufrechtzuerhalten, benötigen sie eine intakte, korrekt gefaltete Zielstruktur. Dagegen erkennen Antikörper meist ein lineares Epitop des Zielproteins, das zudem noch teilweise oder vollständig denaturiert sein kann. Infolgedessen müssen andere Voraussetzungen während der Handhabung des Analyten gewährleistet sein, will man Aptamere zu einem festen Bestandteil des klinischen Alltags machen – eine angesichts der gut etablierten herkömmlichen Methoden nicht zu unterschätzende Hürde.

In Zukunft werden sich Aptamere wahrscheinlich am besten bei der Detektion niedermolekularer Substanzen durchsetzen können, da der Umgang mit der Zielstruktur in diesem Fall weniger problematisch ist. Die Kombination von

Aptameren mit Quantenpunkten könnte fortschrittliche diagnostische Assay-Formate möglich machen.^[111–117] Beispielsweise immobilisierten Levy et al. ein Thrombin erkennendes Aptamer durch ein Streptavidin-Biotin-Verfahren auf Quantenpunkten.^[113,118] Ein hybridisierter Komplementärstrang des Aptamers, ausgestattet mit einer Eclipse-Löschsubstanz, wird effizient durch Zugabe von Thrombin verdrängt. Dies führt zu einer erhöhten Fluoreszenz der Quantenpunkte (Schema 7 A).^[118] Liu und Lu beschrieben einen



Schema 7. Kombination von Quantenpunkten mit Aptameren.
A) Thrombin erkennende Aptamere wurden auf Quantenpunkten immobilisiert (schwarze Kreise). Durch die Hybridisierung von komplementären, mit einem Löschmolekül Q versehenen Oligodesoxynukleotiden am Aptamer wird die Fluoreszenz der Quantenpunkte gelöscht. Zugabe von Thrombin führt zur Ablösung von Q und somit zu einer messbaren Fluoreszenz der Quantenpunkte (graue Kreise). B) Zwei verschiedene Oligodesoxynukleotide, an die sich das Anti-Kokain-Aptamer anlagern kann, werden auf Quantenpunkten (graue Kreise) immobilisiert. Dadurch werden die Quantenpunkte in unmittelbare Nähe zueinander gebracht, und die Lösung der Fluoreszenz wird induziert (schwarze Kreise). Nach der Zugabe von Kokain löst sich das Aptamer, und die Quantenpunkte trennen sich, was sich in einer erhöhten Fluoreszenz widerspiegelt (graue Kreise). C) Das Anti-PSMA-Aptamer, im Komplex mit DOX, wird auf Quantenpunkten immobilisiert (schwarze Kreise), wobei DOX die Fluoreszenz der Quantenpunkte löscht. Die Zugabe von PSMA-positiven Zellen führt zu einer Freisetzung von DOX und damit zu einer erhöhten Fluoreszenz der Quantenpunkte (graue Kreise).

ähnlichen Ansatz: Sie derivatisierten Quantenpunkte mit zwei verschiedenen kurzen Adapter-Oligodesoxynukleotiden. Durch Zugabe eines Aptamers, das teilweise als Verbindungsstück agiert, wird das Fluoreszenzsignal gelöscht, da eine Aggregation von Quantenpunkten in enger Nachbarschaft stattfindet. Nach dem Hinzufügen des Aptamerligan-

den wird die „Schiene“ entfernt, und die Quantenpunkte dissoziieren wieder. Dieser Prozess kann über einen kolorimetrischen Assay quantifiziert werden (Schema 7 B).^[114,119,120] Außer Streptavidin und Biotin verwendeten Lu und Mitarbeiter auch Thiol-modifizierte Aptamere, die effizient auf der Au-Oberfläche der Quantenpunkte immobilisiert wurden. Die Autoren gingen sogar noch einen Schritt weiter und entwickelten einen Schnelltest auf Basis eines Quantenpunkt/Aptamer-Konjugats für die unkomplizierte Detektion von Kokain.^[120,121] Das gleiche Anti-Kokain-Aptamer diente Stojanovic und Landry zur Entwicklung eines kolorimetrischen Nachweises. Im Wesentlichen beruht dieser Assay auf der Konkurrenz von Kokain mit einem unspezifisch am Aptamer gebundenen Cyaninfarbstoff.^[115] Ein eleganter Ansatz verwendet das an Quantenpunkte gekuppelte Anti-PSMA-Aptamer A10 (PSMA = Prostata-spezifisches Membranantigen), wobei die Fluoreszenz der Quantenpunkte durch ein nichtkovalent an das Aptamer gebundenes Doxorubicin-DOX-Molekül gelöscht wird (Schema 7 C). Dieser multifunktionelle Komplex erwies sich als nützlich für die spezifische Erkennung von PSMA exprimierenden Tumorzellen sowie für die Detektion dieser Zellen nach Freisetzung von DOX.^[111] Gleichzeitig kommt es durch die zytostatische Aktivität des Anthracyclinwirkstoffs DOX zur Inhibition des Zellwachstums identifizierter Zellen.^[122] Für die selektive Identifizierung und Visualisierung von Gliomazellen koppelten Chen et al. das 5'-Amino-modifizierte, Tenascin-C bindende Aptamer GBI-10 mithilfe von EDC und Sulfo-NHS an Quantenpunkte.^[123]

2.2. Modifizierte Aptamere als Transportmoleküle

Aptamere mit definierter Struktur und Funktion können zu multifunktionellen Molekülen mit verschiedenen funktionalen Resten zusammengefügt werden. Dies ermöglicht ihre Verwendung als Hilfsmittel für die Entwicklung von Transportmolekülen, die spezifisch bestimmte maligne Zellsubtypen erkennen. Der präparative Zugang zu Aptameren erlaubt die Herstellung von Oligonucleotiden mit einer hohen Stabilität gegen Nucleaseabbau. Der Bottom-up-Aufbau von funktionellen molekularen Einheiten mit mindestens einem Aptamerbaublock eröffnet den Zugang zu multifunktionellen Molekülen. In diesem Zusammenhang wurden Aptamere als spezifische Module zur Erkennung bestimmter Zellsubtypen und Gewebe eingesetzt. Das Aptamer A10, eines der am besten studierten Aptamere, bindet das Prostata-spezifische Membranantigen, ein Zelloberflächenmolekül, das mit dem Ausbruch und Fortschreiten von Krebskrankungen assoziiert ist.^[124] Nach der Modifizierung mit zusätzlichen Molekülen konnte in verschiedenen Studien eine selektive Aptamer-gesteuerte Freisetzung in Krebszellen beobachtet werden (Abbildung 4). Beispielsweise wurden Nanopartikel mit verkapselten Chemotherapeutika (z.B. Docetaxel) mithilfe von NHS/EDC an das modifizierte 5'-Aminoende des Aptamers gebunden.^[125–127] Eine systemische Anwendung dieser Komplexe ermöglicht die effiziente und gezielte Bekämpfung von soliden Tumoren. In einer bahnbrechenden Studie konnten Farokhzad et al. die Effizienz eines solchen

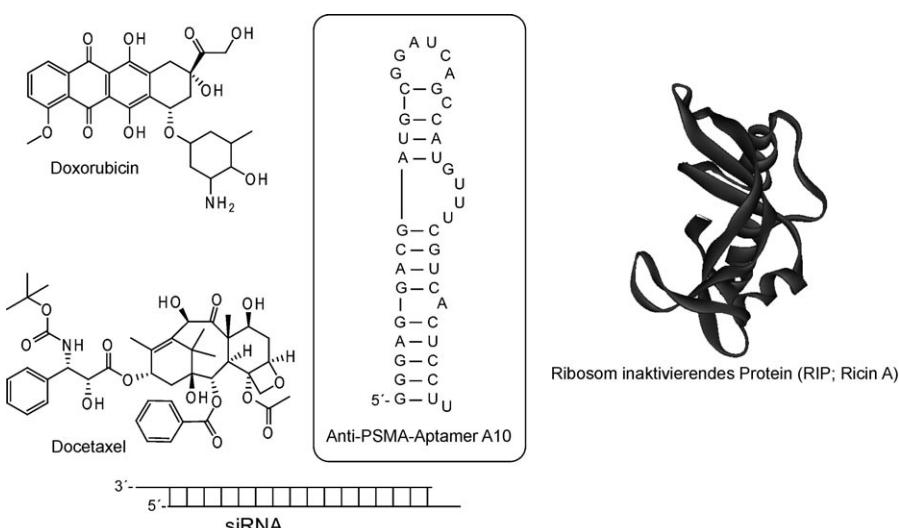


Abbildung 4. Das Anti-PSMA-Aptamer A10 (umrahmt) wurde mit verschiedenen antitumoraktiven Substanzen konjugiert. Alle Pyrimidinnukleotide sind 2'-Fluor-2'-desoxynukleotide. Eine Verknüpfung des Aptamers erfolgte mit den niedermolekularen Substanzen Doxorubicin und Docetaxel sowie mit small interfering RNA (siRNA) und dem Ribosom inaktivierenden Protein Gelonin. Die abgebildete dreidimensionale Struktur repräsentiert Ricin A, ein zu Gelonin homologes Protein, dessen Strukturdaten als Modell für die Strukturbestimmung dienten.^[131]

chimären, beladenen Aptamermoleküls an lebenden Ratten mit einem Xenotransplantat zeigen. Die Aptameruntereinheit A10 wird dabei spezifisch am Tumor lokalisiert, wobei das assoziierte Chemotherapeutikum eine Verkleinerung des Tumors bis hin zur Remission ergab.^[126] Mit der Anwendung dieser Aptamer-basierten, selektiv auf Tumoren gerichteten Systeme können unerwünschte Nebenwirkungen der Therapeutika signifikant verringert werden. In einem zweiten Beispiel komplexierte dieselbe Gruppe das Aptamer A10 direkt mit DOX und erhielt dabei ein so genanntes physikalisches Konjugat, einen nichtkovalenten Komplex aus dem Aptamer und DOX. Auch hier fand bei der Behandlung von Prostatakrebszellen eine signifikante Verringerung der Tumorzellproliferation statt.^[122] Außer Chemotherapeutika lassen sich auch siRNA-Moleküle zu einem chimären siRNA-Aptamer-Konjugat verknüpfen, um die zellspezifische Aufnahme von siRNA-Molekülen zu erleichtern. In diesem Zusammenhang erfolgte die Kupplung von siRNAs entweder direkt an das Aptamer A10 über nucleotidische Verlängerungen^[128] oder indirekt über tetramere Streptavidin-Biotin-Komplexe, wobei zwei biotinylierte Aptamere und zwei biotinylierte siRNA-Moleküle jeweils eine Streptavidineinheit bilden.^[129] Beide Ansätze waren im Hinblick auf eine zellspezifische siRNA-vermittelte Verringerung der entsprechenden mRNA und des Proteinniveaus erfolgreich. Aptamer-Toxin-Konjugate wurden ebenfalls hergestellt, um das Toxin Gelonin, ein Ribosom inaktivierendes Protein, zellspezifisch zu machen.^[130]

Kürzlich fügten Rossi und Mitarbeiter ein zweites Aptamer zur Liste der Aptamer-basierten siRNA-Transfektionsreagentien hinzu. Sie fusionierten ein anti-gp120-bindendes Aptamer über einen Nucleotidarm mit siRNAs, die spezifisch für die HIV-Transkripte tat und rev sind.^[132] Die Behandlung von HIV-1-infizierten Zellen mit diesen Chimären führte zur

Verringerung der entsprechenden mRNA-Transkripte. Mehrere Aptamere wurden beschrieben, die spezifisch Zelloberflächenmoleküle erkennen, darunter Aptamere, die das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin,^[133] den Glutamatrezeptorkanal GluR2,^[134] VCAM-1,^[135] Rezeptor-3 des Epidermalen Wachstumsfaktors^[136] oder das DC-SIGN-Protein^[137] erkennen und somit ebenfalls als elegante, zellspezifische und multifunktionelle Hilfsmittel für die Transfektion von aktiven Therapeutika fungieren könnten.

3. Aptamere zur Identifizierung von Biomolekülen

Aptamere gewinnen immer mehr an Bedeutung für die Identifizierung von Zielmolekülen, die mit bestimmten pathogenen oder nichtpathogenen zellulären Zuständen in Verbindung stehen. Ihre Verwendung kann die Identifizierung von neuen therapeutisch und diagnostisch relevanten Biomolekülen erleichtern, mit dem Ziel, individualisierte medizinische Strategien zu entwickeln. In diesem Zusammenhang werden Aptamere, die spezifische Zelltypen oder Subpopulationen von malignen Zellen (z.B. Tumorzellen) erkennen, selektiert und charakterisiert. Nach Herstellung von monoklonalen Aptameren kann das Zielmolekül auf den Zelloberflächen mithilfe von Aptamer-basierten Pull-down-Experimenten, denen eine SDS-PAGE-Analyse, Proteaseverdau und Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) folgen, identifiziert werden.^[138,139] Das erste Beispiel eines solchen Ansatzes wurde von Blank et al. beschrieben.^[71] In dieser Studie wurden spezifische Aptamere für Rattenendothel-Glioblastomzellen (YPEN) identifiziert. Ein Aptamer konnte nach der Modifizierung mit einem Fluoreszenzmarker am 5'-Ende als effizientes Hilfsmittel zur Färbung der Tumorzellen eingesetzt werden. LC/MS-Analysen ermöglichen die Identifizierung des Proteins Pigpen als mögliches Zielmolekül des Aptamers. Pigpen ist ein Endothel-Proliferationsmarkerprotein, das im proliferierenden Endothel exprimiert wird, allerdings wird die Expression verringert, sobald Konfluenz, d.h. die größtmögliche Zelldichte im Gefäß, erreicht ist.^[140] Dies lässt darauf schließen, dass Pigpen in der Tat ein Marker für den Angiogenesezustand der Endothelzellen ist, was von Blank et al. anhand des Aptamer-basierten Ansatzes schon vorgeschlagen worden war.^[141] Eine nachfolgende Studie von Gold et al. belegt die Eignung des Zell-SELEX-Ansatzes für die Identifizierung von Zielstrukturen. In einem ähnlichen Experiment wurde das Tumorzellen-spezifische Protein Tenascin-C durch ein Aptamer identifiziert, das ursprünglich eine andere Glioblastomzelllinie selektiv erkannt hatte.^[142]

In der Zwischenzeit sind verschiedene SELEX-Experimente für eukaryotische Zellen, Bakterien, Parasiten und

Viren beschrieben worden.^[143–146] Anthraxsporen und Trypanosomen wurden für eine Selektion verwendet, um Sporen neutralisierende Aptamere für die klinische Intervention zu isolieren. Die Zielstrukturen der Aptamere sind noch nicht identifiziert worden, doch konnten die Aptamere mittlerweile erfolgreich zur Virulenzinhibition des Zielmikroorganismus angewendet werden. Die Adressierung von Zelloberflächenmolekülen und Transmembranrezeptoren in ihrer nativen Umgebung ist ein deutlicher Vorteil der Aptamertechnik.^[147] Es werden keine aufwändigen Reinigungsprozesse benötigt, die zu suboptimalen Aktivitäten und Stabilitäten der Biomoleküle führen. Zusammenfassend macht die Erkennung von Zellen durch eine Phänotyp-korrelierende Selektion von Aptameren (z.B. Tumorzellen) einen Forward-genetic-Ansatz möglich. Im Anschluss lassen sich die zugehörigen Zielmoleküle und Antigene identifizieren (Abbildung 5).

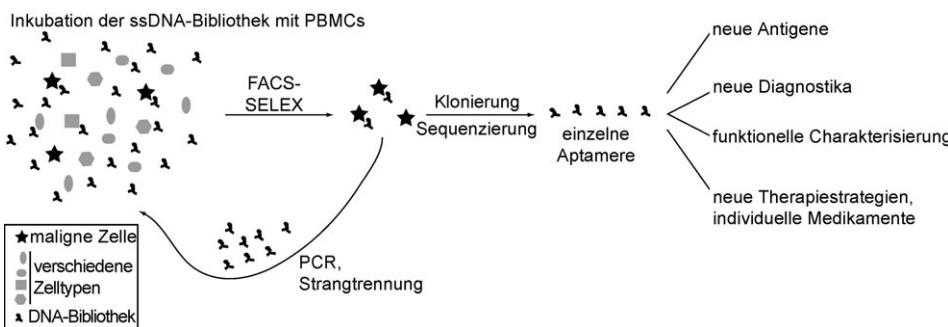


Abbildung 5. Die Identifizierung von Aptameren, die eine bestimmte Zellsubpopulation erkennen, gelingt durch Anwendung eines FACS-Gerätes als Bestandteil des SELEX-Prozesses.^[148,149] Individuelle Aptamere sind Startpunkte für die Identifizierung neuer Antigene, die Entwicklung neuer diagnostischer Werkzeuge, die Charakterisierung der biologischen Funktion des Antigens und die Entwicklung neuer Therapiestrategien. PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.

Kürzlich haben Tan et al. eine In-vitro-Selektion zur Identifizierung von ssDNA-Aptameren (ssDNA = einzelsträngige DNA) für verschiedene immortalisierte Tumorzelllinien angewendet.^[150–153] Unter Verwendung eines Counter-SELEX-Verfahrens konnten sie Aptamere anreichern, die spezifisch mit verschiedenen Tumorzelllinien wechselwirken und bemerkenswerterweise auch an isolierte Primärzellen aus Patienten binden.^[154] Aptamer-basierte Pull-down-Analyse identifizierte die membrangebundene schwere μ -Kette von Immunglobulin als wahrscheinliches Zielmolekül, das auf der verwendeten Burkitt-Lymphoma-Zelllinie (Ramos-B-Zelle) präsentiert wird; RTK7 hingegen kommt als Zielmolekül des zweiten Aptamers, das spezifisch gegen T-Zell-Lymphome selektiert wurde, infrage.^[155,156] Wir haben Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) in den In-vitro-Selektionsprozess implementiert (Abbildung 5), was nicht nur die Selektion von Aptameren mit hoher Affinität ermöglicht, sondern auch die direkte Adressierung bestimmter zellulärer Phänotypen in Zellmischungen.^[148] Dieser Ansatz kann den Weg zu individuellen diagnostischen und therapeutischen Werkzeugen ebnen, da ein direktes Erkennen von Subpopulationen in primären Bluttumorzellen möglich wäre, was einen Schritt in Richtung De-novo-Selektion von Patienten-spezifischen Aptameren bedeuten würde. Vor kurzem

führten Krylov und Mitarbeiter ein ähnliches Zell-SELEX-Experiment mit reifen und unreifen dendritischen Zellen (DCs) durch. Anstatt die monoklonalen Aptamere für die Zielidentifizierung zu verwenden, nutzten sie die gesamte angereicherte Bibliothek als Affinitätsmatrix zur simultanen Identifizierung von Zielmolekülen durch LC/MS-Analyse.^[149] Diese Zielmoleküle könnten neue Biomarker repräsentieren, die mit bestimmten Differenzierungsgraden von reifen und unreifen Zellen korrelieren. Wie dem auch sei, keines der identifizierten Moleküle der zellspezifischen Aptamere wurde bis jetzt gereinigt und homogenen Bindungsanalysen unterzogen.

Die begrenzte Zahl an Proteinen, die bisher durch eine Aptamer-basierte Pull-down-Analyse identifiziert werden konnten, lässt erahnen, wie schwierig Selektionen gegen vitale Zellpopulationen sind – daher überrascht es nicht, dass

sich diese Technik noch im Anfangsstadium befindet. Darüber hinaus wird für die Identifizierung von Zielmolekülen eine große Menge an gebundenen Molekülen und somit eine große Zahl von Zellen benötigt. James und Fitter haben gezeigt, dass für eine In-vitro-Selektion auch eine Teilmenge von Proteinen, wie sie z.B. im Blut gefunden werden kann, als Zielmischung ausreicht.^[157] Ein ähnliches Selektionsprotokoll wurde von Layzer und Sullenger eingeführt. Sie selektierten Aptamere gegen das Gamma-Carboxyglutaminsäure enthaltene Proteom aus dem huma-

nen Plasma.^[158] Bei beiden Ansätzen konnten simultan Aptamere gegen verschiedene Zielstrukturen angereichert werden. Wegen der begrenzten Zahl möglicher Zielstrukturen ist die Identifizierung passender Aptamer-Zielstruktur-Paare bei diesen Ansätzen möglicherweise wesentlich einfacher als bei Gesamt-Zell-SELEX-Experimenten. Wendel und Mitarbeiter haben Aptamere für Stammzellen für deren Isolierung aus Mischungen identifiziert. Das Ziel ist letztlich die Aggregation bestimmter Zellsubtypen mithilfe spezifischer funktioneller Materialien.^[159–163] Dieser Ansatz kann zu „intelligenten“ Materialien auf Aptamerbasis führen.

4. Aptamere für die Zielstrukturvalidierung

Aptamere sind potente Inhibitoren ihrer Zielmoleküle und eignen sich daher besonders für deren Validierung und funktionelle Charakterisierung. Im letzten Jahrzehnt gab es verschiedene Studien, in denen Aptamere für die Validierung der Funktion eines Biomoleküls in Zellkulturexperimenten und *in vivo* eingesetzt wurden.^[164–166] Für die In-vivo-Charakterisierung können die Stabilität und die pharmakokinetischen Parameter durch positionsspezifische Modifikationen wie 2'-Fluor-, 2'-Amino-, 2'-Methoxynucleotide sowie das

Anbringen von CAP-Strukturen (wie 3'-3'-dT) und Polyethylen glycol (PEG) verändert werden.^[167,168] Dies ermöglicht die vielseitige Anwendung von Aptameren in unterschiedlichen experimentellen Aufbauten und letztlich ihren Einsatz als Wirkstoffe. Die Aptamertechnik macht eine Vielzahl von Anwendungen für die Zielvalidierung und das direkte Erkennen endogener Proteine möglich. Die Synthese von RNA-Aptameren durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie ist von großem Vorteil und bietet sicherlich eine Alternative gegenüber der Transfektion (Abbildung 6).^[165,169–172] Die Analyse und Verbesserung der In-vivo-Aktivität von in vitro selektierten Aptameren durch eine auf dem Hefe-3-Hybrid-System beruhende Selektion ist kürzlich beschrieben worden.^[173–177]

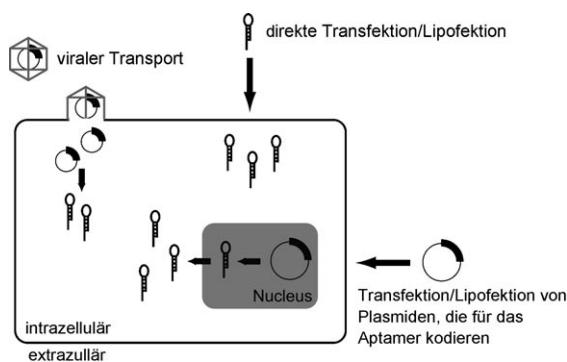


Abbildung 6. Zelluläres Einbringen von Aptameren. Aptamere können durch modernste Lipofektionsverfahren transfiziert oder durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie in der Zelle exprimiert werden. Für die zweite Möglichkeit wurden Transfektionen mit Plasmiden, die für das Aptamer kodieren, oder Infektionen mit rekombinanten Viren, die die genetische Information für die Aptamerproduktion enthalten, beschrieben.

Lipid-basierte Transfektionen, die für die Transmembranlokalisierung von Plasmiden und siRNA-Molekülen eingesetzt werden, lassen sich ebenfalls für das Einbringen von Aptameren in das Cytosol nutzen (Abbildung 6).^[178] In einer bahnbrechenden Studie von Lis et al. werden andere Methoden wie Mikroinjektion, Rezeptor-vermittelte Internalisierung und die Entwicklung transgener Tiere, die das Aptamer unter Kontrolle eines konditionalen Promoters exprimieren, vorgestellt. Diese Methoden könnten sehr hilfreich sein, um ein Aptamer in die Zelle einzuschleusen.^[179] Die Überprüfung von intrazellulären Zielmolekülen mit Aptameren ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da hierbei neben den kinetischen und thermodynamischen Parametern auch die cytoplasmatische Bereitstellung des Aptamers entscheidend ist. Jede Methode hat ihre Einschränkungen und muss hinsichtlich Transfektionseffizienz und Ausleseformat optimiert werden (ebenfalls abhängig vom Zelltyp). Primärzellen, Gewebe und Organe lebender Tiere sind alles andere als gute Ziele moderner Lipid-basierter Transfektionsverfahren. Die Verwendung von ausgereiften rekombinanten Viren für die Transfektion könnte hilfreich sein, doch sind wegen der arbeitsintensiven Vorgehensweisen kaum Publikationen hierüber zu finden.^[164,165,180] Weitere Studien werden notwendig sein, um die breite Anwendbarkeit viraler Transfektionsmethoden nachzuweisen.

Ein alternativer Ansatz könnte aus den siRNA-Transfektionsmethoden abgeleitet werden. SiRNA-Moleküle konnten in verschiedene Gewebe eingebracht werden, indem sie mit passenden Transportmolekülen, wie Peptiden, Lipiden, Cholesterol oder sogar zellspezifischen Aptameren, ausgestattet wurden.^[128,181–185] Trotzdem wurde bis jetzt noch keiner dieser Ansätze für die Aptamertransfektion eingesetzt. Es ist von großem Interesse, ob lipid- oder peptidvermittelte Transfektionen ebenfalls für die zelluläre Translokalisierung von Aptameren geeignet sind. Ähnlich zu den Off-Target-Effekten, die bei der Anwendung von siRNA-Molekülen beobachtet werden,^[186,187] muss den sekundären endogenen Zielmolekülen und Off-Target-Effekten von Aptameren in zukünftigen Experimenten intensive Beachtung geschenkt werden; nur dies ermöglicht die präzise Interpretation des Aptamer-induzierten Phänotyps. Für einen umfassenden und zuverlässigen Vergleich der Aptamertechnik zur Zielmolekülderivierung mit anderen Techniken auf zellulärer Ebene ist eine Gegenüberstellung dieser Daten zwingend erforderlich.^[188] Daten zur Funktion eines Zielmoleküls, die bei der Aufklärung einer Zielstruktur auf Proteinebene durch die Anwendung von Aptameren generiert werden, sind komplementär zu entsprechenden Daten aus siRNA- und Knock-out-Experimenten. Die Kombination beider Methoden könnte eine genaue Analyse der Funktion eines Biomoleküls möglich machen.

In einer aktuellen Studie demonstrierten Clary et al., dass sich wirkstoffresistente Phänotypen von Krebszellen, die eine DOX-Unempfindlichkeit zeigen, durch die synergistischen Wirkungen eines Aptamers gegen NF-κB unterdrücken lassen.^[174,189,190] DOX-Resistenz entwickelt sich durch eine Aktivierung von NF-κB, weshalb das Anti-NF-κB-Aptamer einen positiven Einfluss hatte. In einer anderen Studie fanden Chan et al. heraus, dass die Expression des Anti-NF-κB-Aptamers in Kombination mit einem Anti-NF-κB-siRNA-Molekül zu einer quantitativen Inhibition der NF-κB-Funktion in Säugetierzellen (Hela) führte. Dagegen lässt sich eine nicht-quantitative Inhibition bei einer getrennten Expression des Aptamers oder des siRNA-Moleküls beobachten.^[191] Das Aptamer AGRO100, auch bekannt unter dem Namen AS1411, erkennt Nucleolin; es gehört zur Familie der G-reichen Oligodesoxynukleotide, die dafür bekannt sind, stabile G-Quartettstrukturen zu bilden und die Proliferation von Krebszellen zu inhibieren.^[192,193] Dieses Aptamer wurde in klinischen Studien als Tumortherapeutikum eingesetzt. Die Inhibition der Krebszellproliferation beruht darauf, dass das Aptamer mit Cofaktoren wie der Methyltransferase 5 oder NF-κB essential Modulator (NEMO) um die Assoziation mit Nucleolin konkurriert. Dies lässt darauf schließen, dass Nucleolin für die NF-κB-Regulation notwendig ist.^[194,195] In einer weiteren Studie führte die Behandlung von Brustkrebszellen mit AGRO100 zu einer erhöhten Instabilität des BCL-2-mRNA-Transkripts.^[196] Diese Daten zeigen, dass die genaue Analyse des Wirkmechanismus eines Aptamers zu neuen Erkenntnissen über die Molekularbiologie des Zielmoleküls führen könnte und so den Weg hin zu neuen Zielmolekülen für die Entwicklung neuartiger Therapien ebnen kann.

5. Wirkstoffentwicklung mithilfe von Aptameren

Die Modifizierung von Aptameren mit fluoreszierenden Reportergruppen ermöglicht ihren Einsatz in Screening-Experimenten bei hohem Durchsatz. In diesen Experimenten wird das Aptamer als kompetitive Reportersonde eingesetzt, um niedermolekulare Molekülbibliotheken nach Verbindungen zu durchsuchen, die das Zielprotein binden können und dementsprechend mit dem Aptamer um die Bindung konkurrieren. Die erste Veröffentlichung in diesem Bereich stammt aus dem Jahr 2001: Green et al. verwendeten ein Anti-PDGF-Aptamer bei der Durchsuchung einer kleinen Bibliothek niedermolekularer Substanzen, von denen man wusste, dass sie PDGF binden und seine Funktion, analog zum selektierten Aptamer, inhibieren.^[197,198] Während bei der Studie von Green et al. radioaktiv markierte Aptamere eingesetzt wurden, verwendeten Famulok und Mitarbeiter so genannte Aptazyme für das Hochdurchsatz-Screening.^[199,200] Aptazyme sind RNA-Moleküle, die aus zwei Domänen aufgebaut sind: eine *cis*- oder *trans*-spaltende Ribozymdomäne und eine zweite Aptamerdomäne, die nach Bindung eines Effektormoleküls in der Ribozymdomäne einen Konformationswechsel induziert.^[201,202] Dieser Aufbau kann zur exogenen Kontrolle der Ribozymaktivität sowie zum Screening einer Bibliothek diverser Antibiotika, die mit dem Anti-HIV-1-*rev*-Aptamer um die Bindung an das rev-Protein konkurrieren, genutzt werden. Bemerkenswerterweise hat die identifizierte Verbindung Cumermycin A1 Aptamer-ähnliche Eigenschaften und inhibiert die Virusreplikation im Zellkulturnmodell (Abbildung 7). Mithilfe eines sehr ähnlichen Ansatzes unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Bibliothek niedermolekularer Substanzen wurden Inhibitoren der reversen Transkriptase von HIV-1 identifiziert (Abbildung 7).^[203] Die Verbindung SY-3E4 hemmte die Virusreplikation bei HIV-1-Stämmen, die gegen bekannte Reverse-Transkriptase-Inhibitoren resistent sind. Die Herstellung von Aptazymen ist allerdings kompliziert – will man Aptazyme in der Zukunft tatsächlich zur Regulation der Genexpression einsetzen,^[204–207] so müssen hier einfache Verfahren entwickelt werden, die eine Anpassung eines Aptamers an universelle Screening-Anwendungen ermöglichen.

Ein entsprechender Ansatz beruhte auf Fluoreszenzpolarisierung und fluoreszenzmarkierten Aptameren. Dabei stammte das Auslesesignal direkt vom Aptamer und korrelierte strikt mit dem Zustand der Bindung zum Zielmolekül.^[208,209] Diese Strategie führte zur Identifizierung von SecinH3, das Cytohesin bindet und mit dem Anti-Cytohesin-Aptamer M69 konkurriert (Abbildung 7).^[164,210] Außerdem war die Verbindung bei der weiteren Aufklärung der Funktion von Cytohesinen in Tieren hilfreich.^[210,211] Mithilfe eines anderen Ansatzes identifizierten Li et al. einen neuen Inhibitor der Adenosin-Desaminase.^[212] Ihr Screening-Assay basierte auf einem Aptamer, das nur Adenin und nicht das Produkt der Desaminase-Enzymaktivität erkennt. Auf diese Weise konnte mit dem Aptamer die enzymatische Aktivität verfolgt werden. Eine ähnliche Strategie verfolgten Srinivasan et al.^[213] Sie verwendeten ein Aptamer, dessen Affinität zu Adenosindiphosphat 330-mal höher war als zu Adenosintriphosphat. Dieses Aptamer ist ein nützliches Reagens zur

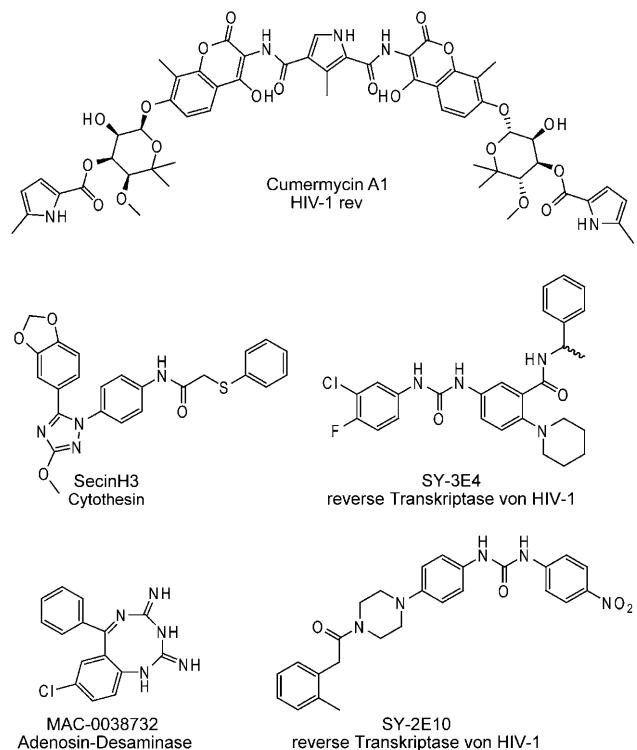


Abbildung 7. Niedermolekulare Wirkstoffe, identifiziert durch Aptamer-basierte Screening-Experimente bei hohem Durchsatz. Der Name der Verbindung (oben) und das primäre biologische Ziel (unten) sind aufgeführt.

Detektion von Adenosindiphosphat, das bei Kinaseaktivitäten aus Adenosintriphosphat gebildet wird.

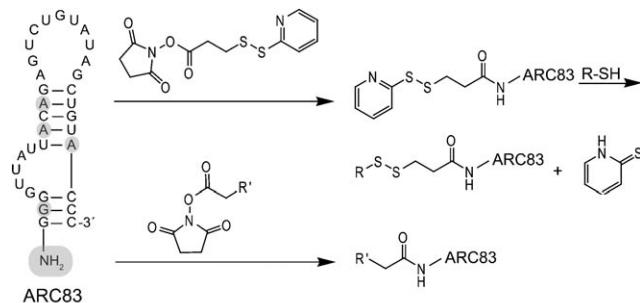
Die hier aufgeführten Beispiele demonstrieren, dass Aptamere zur Identifizierung niedermolekularer Substanzen mit proteinhemmenden Eigenschaften eingesetzt werden können. Große Aufmerksamkeit erregte ein Ansatz, der es ermöglicht, durch direkte Konkurrenz-Assays und Fluoreszenzdetektion die chemischen Informationen, die in der Struktur des Aptamers gespeichert sind, auf eine niedermolekulare Substanz zu übertragen.^[208,214] Durch diese Methoden identifizierte Verbindungen zeigten Aptamer-ähnliche Aktivitäten und stellen so eine direkte Verbindung zwischen Makromolekülen und niedermolekularen Verbindungen her. Abbildung 7 gibt einen Überblick über Protein-Inhibitoren, die durch Techniken auf Aptamerbasis identifiziert wurden.

6. Aptamere als Wirkstoffe

Aptamere können nicht nur zur Entdeckung niedermolekularer Wirkstoffkandidaten verwendet werden – sie können auch selbst Wirkstoffe sein.^[215] In der Tat war dies eines der ersten Gebiete, das als vielversprechend für einen Einsatz von Aptameren angesehen wurde. Da Aptamere nur eingeschränkt membrangängig sind, wurde eine große Mehrheit von ihnen gegen extrazelluläre Proteine selektiert. Wie schon in Abschnitt 2 besprochen, lassen sich Aptamere mit einer erhöhten Stabilität gegenüber Nucleasen isolieren, indem modifizierte Nucleotide, die mit den enzymatischen

Schritte der Selektion kompatibel sind, eingesetzt werden. Alternativ sind Aptamere auch nach der Selektion modifizierbar. Dabei werden sie mit verschiedenen chemischen Einheiten ausgestattet, die ihre Stabilität erhöhen und zu einer verbesserten Pharmakokinetik führen.^[167,168]

Healy et al. haben den Einfluss unterschiedlicher Modifizierungen – z.B. PEG20, PEG40, Cholesterol oder zell-durchlässiger Peptide (tat/antennapedia) – auf die Pharmakokinetik und Bioverteilung des Anti-TGFβ-2-Aptamers untersucht (Schema 8).^[168] Das Aptamer wurde mit 2'-Fluor-



R = Peptid mit C-terminalem Cystein

R' = Polyethylenglycol (PEG (20 kDa) oder (PEG 40 kDa))

Schema 8. Das Anti-TGFβ-2-Aptamer ARC83 besteht aus 2'-Fluor-urimid-Nucleotiden und 2'-Methoxy-modifizierten Purinen (unmodifizierte Positionen sind grau). Die 5'-Position trägt eine Aminogruppe, um weitere Modifizierungen zu erleichtern, z.B. Peptidkupplungen über C-terminale Cysteinreste mit dem kommerziell erhältlichen Reagens N-Succinimidyl-3-(2-pyridylidithio)propionat (SPDP) oder die Einführung von Polyethylenglycolresten unter Verwendung von NHS.

und 2'-Methoxy-Modifikationen ausgestattet, da die nicht-modifizierte Form in Blut binnen 48 Stunden nach der Injektion komplett abgebaut wird. In Einklang mit früheren Studien erhöhte eine Konjugation mit PEG die Halbwertszeit. Cholesterol-modifizierte Aptamere wurden schneller aus dem Plasma entfernt; dieser Vorgang wurde entgegen der Erwartung nicht durch Zugabe zelldurchlässiger Peptide beschleunigt. Eine erhöhte Akkumulation des Aptamers in den Nieren erfolgte bei einer Konjugation mit dem Antennapedia-Peptid. Alle Modifikationen führten indes zu einer signifikanten Anreicherung des Aptamers in Niere, Leber, Milz, Herz und mediastinalen Lymphknoten. Dieses Beispiel veranschaulicht, wie verschiedene funktionelle Gruppen die pharmakokinetischen Eigenschaften von Aptameren verändern. Dennoch muss jeder Aptamer-Wirkstoffkandidat individuell untersucht werden, da es sequenzabhängige Unterschiede in der Bioverteilung und Pharmakokinetik gibt.

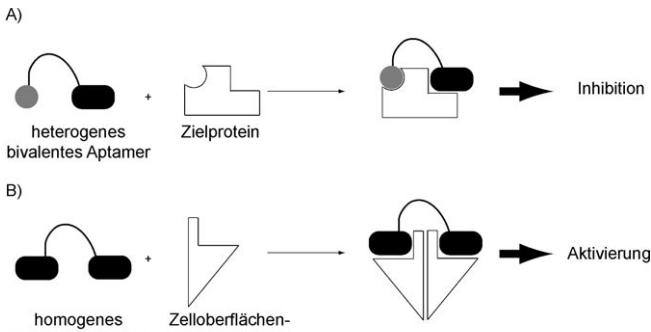
Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hat bis jetzt nur ein Aptamer, Macugen, als Wirkstoff zugelassen, die Zulassung weiterer wäre sehr wichtig für das Gebiet. Gegenwärtig werden einige aussichtsreiche Aptamere und Spiegelmerle (RNA-Aptamere mit L-Enantiomer-Baublöcken)^[216,217] in klinischen Studien bei unterschiedlichen Indikationen und Krankheitsbildern angewendet (Tabelle 1). Neben der Behandlung von Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen hat die Anwendung als Antikoagulanz die größte Bedeutung für Aptamere.^[209] Das erste zu diesem

Tabelle 1: Aptamere, die derzeit in klinischen und präklinischen Studien bewertet werden.

Aptamer	Zielstruktur	Krankheitsbild
NOX-B11	Ghrelin	Adipositas
E-10030	Platelet-derived growth factor (PDGF)	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)
NU172	Thrombin	aortokoronarer Bypass(CABG)
ARC1779	Von-Willebrand-Faktor	akutes Koronarsyndrom (ACS)
AS1411	Nucleolin	chronische myeloische Leukämie (AML)
REG1	Faktor IXa	aortokoronarer Bypass(CABG)

Zweck eingesetzte Aptamer war ein Anti-Thrombin-G-Quadruplex bildendes 15-meres Oligodesoxynucleotid.^[218–220] Es wurden bereits klinische Studien der Phase I mit dem Aptamer, das unter dem Namen ARC183 oder HD1 während Aortokoronarer-Bypass-Operationen (CABG) einsetzbar ist, durchgeführt. Da zum Erzielen einer Wirkung jedoch die Verabreichung hoher Dosen erforderlich war, wurde die Entwicklung jedoch anschließend gestoppt.^[221]

Kürzlich wurden verbesserte Anti-Thrombin-Aptamere entwickelt, die auf dem Konzept der Multivalenz beruhen. Dabei wurden Exosite I und Exosite II bindende Aptamere durch Brückeneinheiten verknüpft, um ein bivalentes Aptamer mit vorzüglichen Aktivitäten zu kreieren (Schema 9 A).^[222,223] Wir konnten die außerordentlichen antikoagulierenden Eigenschaften des bivalenten Anti-Thrombin-Aptamers demonstrieren, das obendrein den Vorteil hat, dass es sich durch zugeschnittene komplementäre (Antisense-) Moleküle inaktivieren lässt.^[224] Ursprünglich beschrieben 2002 Sullenger und Mitarbeiter den Einsatz komplementärer Oligonucleotide als Antidot für Aptamere.^[225–227] Sie entwickelten ein Aptamer, das den Blutkoagulationsfaktor IXa erkennt. Zusätzlich konnte die antikoagulierende Aktivität in vivo für die 5'-Cholesterol- und 3'-Desoxythymidin-CAP-modifizierte Variante des Anti-FIXa-Aptamers nachgewiesen werden. Ein 2'-Methoxy-derivatisierter Antisense-Strang, der komplementär zu 17 Nucleotiden des Aptamers ist, zeigte eine Interferenz mit der Aptameraktivität im Mausmodell und beim Menschen.^[228–230] Ein anderes Aptamer, das den Von-Willebrand-Faktor (vWF) erkennt, wurde schon in kli-



Schema 9. Bivalente Aptamere. A) Heterobivalente Aptamere (graue und schwarze Fläche), die ein Protein über zwei verschiedene Domänen erkennen, können verbesserte Hemmeigenschaften aufweisen. B) Homobivalente Aptamere (schwarze Fläche), die Zelloberflächenrezeptoren erkennen, können eine Rezeptordimerisierung induzieren und so Zellsignalwege aktivieren.

nischen Studien eingesetzt. Dieses Aptamer wird als Antithrombosereagens für die Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) in Erwägung gezogen. Erste Studien am Menschen haben die Erwartungen erfüllt: Sie belegten eine Inhibition der vWF-vermittelten Aggregation der Blutblättchen *in vivo*.^[231] Oney et al. demonstrierten mit einem zugeschnittenen Antisense-Molekül, dass die Inhibitoraktivität des Anti-vWF-Aptamers umkehrbar ist.^[232] Unter diesem Aspekt kann das Sicherheitsprofil von Aptamer-basierten Medikamenten verbessert werden, und ungünstige Nebenwirkungen lassen sich minimieren.

Wie oben erwähnt, ist Macugen (oder Pegaptanib Sodium Injection) das einzige von der FDA zugelassene Aptamer. Es wird für die Behandlung der feuchten Form der altersbedingten Maculadegeneration (AMD) eingesetzt.^[233] Macugen erkennt die 165 Aminosäuren der verkürzten Isoform des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Es wird durch eine intravitreale Injektion von 6 nmol alle sechs Wochen verabreicht. Macugen wirkt effizient und hoch spezifisch (auch bei verschiedenen VEGF-Isoformen) und gilt damit als sehr sicher. Da VEGF eine wichtige Rolle bei physiologischen Ereignissen spielt, ist dieser Umstand überaus wichtig. Die Behandlungskosten sind mit 12 500 \$ allerdings sehr hoch.^[234] Alternativ kann AMD mit Antikörper-abgeleiteten VEGF-Inhibitoren wie Bevacizumab und Ranibizumab behandelt werden.^[235,236] Ranibizumab wurde 2006 von der FDA für die Behandlung von AMD-Patienten zugelassen, da eine Verbesserung des Sehvermögens nachgewiesen werden konnte. Dieser bemerkenswerte Befund unterscheidet die Antikörperbehandlung von anderen verfügbaren Therapien und könnte durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an alle VEGF-Isoformen erklärt werden.

Sullenger und Mitarbeiter führten unlängst agonistische Aptamere ein, die T-Zellen stimulieren können und dabei das Tumorgewachstum in Mäusen effizient inhibieren. Sie identifizierten den costimulatorischen Rezeptor 4-1BB, der in aktivierte T-Zellen hochreguliert ist, als Zielstruktur eines Aptamers.^[237] Agonistische Antikörper, die 4-1BB binden, erhöhen die Tumorrückbildung und Tumorabstoßung in Mäusen.^[238] Ein multivalentes Aptamerkonstrukt aus zwei identischen Aptamerdomänen, die durch eine zentrale Stammstruktur verbunden sind, zeigte ganz ähnlich eine effektive T-Zellstimulation und induzierte Tumorabstoßung in Mäusen (Schema 9B). Erst kürzlich erweiterte die gleiche Gruppe den Ansatz der bivalenten agonistischen Aptamere auf das Zielmolekül OX40 (einen Tumornekrosefaktor-Rezeptor).^[239]

Entsprechend beschrieben Wang et al. die Identifizierung eines Aptamers für Midkine, einen Heparin bindenden Wachstumsfaktor. Durch die Anwendung des Aptamers kam es zu einer Vermehrung von regulatorischen T-Zellen, die wiederum Symptome für die experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE), ein Modell für die schwerwiegende Krankheit Multiple Sklerose, verringerten.^[240]

Dies sind interessante Beispiele für an Zelloberflächenrezeptoren bindende bivalente Aptamere, die nach der Umwandlung in agonistische Varianten analog zu Antikörpern die Aggregation (Clustering) von Rezeptoren hervorrufen können. Die vorgestellten Beispiele zeigen Möglichkeiten für

hoch entwickelte Therapieansätze auf, die auf den überragenden Aktivitäten von Aptameren und modifizierten Varianten beruhen. Aptamere könnten dank ihrer geringen Immunogenität und ihrer guten Zellerkennungseigenschaften als Wirkstoffe mit geringen Nebenwirkungen infrage kommen. Dennoch müssen Nebenwirkungen von Aptameren, z.B. Toll-like-Rezeptor-vermittelte immunologische Antworten auf dem B- und T-Zell-Niveau, genau untersucht werden – allerdings werden Langzeitstudien zur Sicherheit von Aptamerbehandlungen erst dann verfügbar sein, wenn weitere Aptamere zugelassen und in der Klinik angewendet werden sind.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Seit ihrer ersten Beschreibung 1990 haben sich Aptamere zu einem ausgereiften Forschungsgebiet entwickelt, das wichtige Beiträge zur biologischen und medizinischen Forschung leistet. Der präparative und enzymatische Zugang zu Aptameren ermöglicht deren seitenspezifische und gezielte Modifizierung, um sie für verschiedene Anwendungen – für die Zielvalidierung, als Diagnostika und als Wirkstoffe – anzupassen. Aptamere haben den Vorteil, dass sie keine Immunantwort auslösen, zumindest auf Antikörperebene. Eine mögliche Anwendung von Aptameren ist auch die Identifizierung von Zelloberflächenrezeptoren, die mit einem pathogenen Zustand der Zelle assoziiert sind; weitere Forschungen werden zeigen, ob die Aptamertechnik auch einen Beitrag zu diesem Gebiet leisten kann. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Aptamertechnik als eine integrierte Technologieplattform dar. Die Identifizierung von Aptameren ist allerdings arbeitsintensiv, weshalb zur Zielstrukturvalidierung noch immer bevorzugt andere Techniken auf Nukleinsäurebasis, wie die siRNA- oder die Antisense-Technik, eingesetzt werden. Zur Verringerung des Arbeitsaufwands ist die Entwicklung von einfachen SELEX-Verfahren, z.B. durch das Bereitstellen sofort einsetzbarer SELEX-Kits, erforderlich; jeder geübte Wissenschaftler oder technische Assistent könnte so die Methode der In-vitro-Selektion anwenden. Für die Charakterisierung eines identifizierten Zielgens durch siRNAs sind Protein-Inhibitoren zwingend erforderlich, ansonsten könnte die Interpretation der Phänotypen wegen Off-Target-Effekten suboptimal sein.^[241–243] Aptamere und siRNAs ergänzen sich daher, und durch ihre Kombination könnte man eine leistungsfähige Technik erhalten. Aptamere sind exzellente Hilfsmittel für die chemische Biologie. Die präzise Anwendung und Aktivitätskontrolle von Aptameren ermöglichen die genaue Erkennung und hochauflöste Analyse von Biomolekülen. In aktuellen Arbeiten wurden Aptamere zur Identifizierung niedermolekularen Wirkstoffen eingesetzt, die Aptamer-ähnliche Eigenschaften aufweisen. Dies könnte den Weg zur Entwicklung neuartiger Protein-Inhibitoren ebnen. Die kommenden Jahre werden zeigen, ob sich die Aptamere als neue Wirkstoffklasse und diagnostisches Werkzeug für den klinischen Alltag durchsetzen vermögen.

Ich möchte mich bei allen früheren und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe sowie bei den Kollaborationspartnern für ihre Beiträge bedanken, vor allem bei Michael Famulok für die Bereitstellung der exzellenten Infrastruktur. Uli Hahn danke ich für den Zuspruch, meine akademische Laufbahn weiterzuführen. Ich danke Jeffrey Hannam und Alexander Heckel für das kritische Lesen des Manuskripts. Für die finanzielle und materielle Unterstützung durch den BMBF, den Fonds der Chemischen Industrie, die Europäische Union, Evonik, NascaCell Technologies AG und die Deutsche Forschungsgemeinschaft bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Eingegangen am 22. September 2008

- [1] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 217.
- [2] I. Haruna, K. Nozu, Y. Ohtaka, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, 50, 905.
- [3] I. Haruna, S. Spiegelman, *Science* **1965**, 150, 884.
- [4] I. Haruna, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 54, 579.
- [5] G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6540; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6420.
- [6] K. Mullis, F. Falloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Biochemistry* **1992**, 24, 17.
- [7] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487.
- [8] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Falloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350.
- [9] K. B. Mullis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1271; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1209.
- [10] D. H. Bishop, N. R. Pace, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 1790.
- [11] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818.
- [12] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505.
- [13] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, 344, 467.
- [14] A. Heckel, M. Famulok, *Biochimie* **2008**, 90, 1096.
- [15] G. Mayer, D. Ackermann, N. Kuhn, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 985; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 971.
- [16] G. Rasched, D. Ackermann, T. L. Schmidt, P. Broekmann, A. Heckel, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 981; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 967.
- [17] C. Lin, X. Wang, Y. Liu, N. C. Seeman, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14475.
- [18] P. W. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297.
- [19] M. Famulok, A. Huttenhofer, *Biochemistry* **1996**, 35, 4265.
- [20] H. Schürer, K. Stembera, D. Knoll, G. Mayer, M. Blind, H. H. Forster, M. Famulok, P. Welzel, U. Hahn, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2557.
- [21] K. K. Farh, A. Grimson, C. Jan, B. P. Lewis, W. K. Johnston, L. P. Lim, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Science* **2005**, 310, 1817.
- [22] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, 116, 281.
- [23] G. Mayer, M. S. Raddatz, J. D. Grunwald, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 563; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 557.
- [24] J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Sci. Am.* **2007**, 296, 50.
- [25] B. J. Tucker, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 342.
- [26] A. Rentmeister, G. Mayer, N. Kuhn, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 3713.
- [27] J. B. Tok, N. O. Fischer, *Chem. Commun.* **2008**, 1883.
- [28] S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5387.
- [29] S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9382.
- [30] M. Berezovski, A. Drabovich, S. M. Krylova, M. Musheev, V. Okhonin, A. Petrov, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3165.
- [31] A. Drabovich, M. Berezovski, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11224.
- [32] D. D. Buchanan, E. E. Jameson, J. Perlette, A. Malik, R. T. Kennedy, *Electrophoresis* **2003**, 24, 1375.
- [33] E. Kraus, W. James, A. N. Barclay, *J. Immunol.* **1998**, 160, 5209.
- [34] T. S. Misono, P. K. Kumar, *Anal. Biochem.* **2005**, 342, 312.
- [35] J. Müller, O. El-Maarri, J. Oldenburg, B. Potzsch, G. Mayer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 1033.
- [36] D. Eulberg, K. Buchner, C. Maasch, S. Klussmann, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, e45.
- [37] J. C. Cox, A. D. Ellington, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2525.
- [38] A. Wochner, B. Cech, M. Menger, V. A. Erdmann, J. Glöckler, *Biotechniques* **2007**, 43, 344.
- [39] G. Mayer, B. Wulfen, C. Huber, J. Brockmann, B. Flicke, L. Neumann, D. Hafenbradl, B. M. Klebl, M. J. Lohse, C. Krasel, M. Blind, *Rna* **2008**, 14, 524.
- [40] J. H. Davis, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11616.
- [41] J. Hamm, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 2220.
- [42] A. Bugaut, J. J. Toulme, B. Rayner, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 4082.
- [43] M. Famulok, G. Mayer, *ChemBioChem* **2005**, 6, 19.
- [44] M. Rimmele, *ChemBioChem* **2003**, 4, 963.
- [45] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 611.
- [46] Sollte ich wegen der Fülle an Literatur zu Aptameren einige Studien übersehen haben, bitte ich dies zu entschuldigen.
- [47] A. D. Keefe, S. T. Cload, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 448.
- [48] R. M. Orr, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, 3, 288.
- [49] X. Yang, S. E. Bassett, X. Li, B. A. Luxon, N. K. Herzog, R. E. Shope, J. Aronson, T. W. Prow, J. F. Leary, R. Kirby, A. D. Ellington, D. G. Gorenstein, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 132e.
- [50] J. T. Holmlund, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, 1002, 244.
- [51] J. Chelliserrykattil, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 1155.
- [52] R. Padilla, R. Sousa, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 138e.
- [53] R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *ChemBioChem* **2007**, 8, 490.
- [54] R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8124.
- [55] J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2817.
- [56] S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3337.
- [57] S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15071.
- [58] N. Lin, J. Yan, Z. Huang, C. Altier, M. Li, N. Carrasco, M. Suyemoto, L. Johnston, S. Wang, Q. Wang, H. Fang, J. Caton-Williams, B. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 1222.
- [59] J. F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 958.
- [60] P. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3442.
- [61] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639.
- [62] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4900.
- [63] A. Heckel, M. C. Buff, M. S. Raddatz, J. Muller, B. Potzsch, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6900; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6748.
- [64] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 822.
- [65] G. Mayer, L. Krock, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *Chem-BioChem* **2005**, 6, 1966.
- [66] J. Hesselberth, M. P. Robertson, S. Jhaveri, A. D. Ellington, *J. Biotechnol.* **2000**, 74, 15.
- [67] J. R. Hesselberth, M. P. Robertson, S. M. Knudsen, A. D. Ellington, *Anal. Biochem.* **2003**, 312, 106.

- [68] M. Famulok, G. Mayer, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, 243, 123.
- [69] G. Sengle, A. Jenne, P. S. Arora, B. Seelig, J. S. Nowick, A. Jaschke, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1317.
- [70] B. Seelig, A. Jaschke, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 167.
- [71] M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, H. Schluesener, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 16464.
- [72] H. Ulrich, A. H. Martins, J. B. Pesquero, *Cytometry* **2004**, 59 A, 220.
- [73] A. Eisenführ, P. S. Arora, G. Sengle, L. R. Takaoka, J. S. Nowick, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 235.
- [74] B. Seelig, A. Jaschke, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 371.
- [75] S. Pfander, R. Fiammengo, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, A. Jaschke, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e25.
- [76] F. Hansske, F. Cramer, *Methods Enzymol.* **1979**, 59, 172.
- [77] C. Baugh, D. Grate, C. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 117.
- [78] D. Grate, C. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6131.
- [79] M. Müller, J. E. Weigand, O. Weichenrieder, B. Suess, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2607.
- [80] S. Hanson, G. Bauer, B. Fink, B. Suess, *RNA* **2005**, 11, 503.
- [81] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4928.
- [82] S. Sando, A. Narita, Y. Aoyama, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1795.
- [83] C. A. Savran, S. M. Knudsen, A. D. Ellington, S. R. Manalis, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3194.
- [84] M. D. Schlensoog, T. M. A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, *Sens. Actuators B* **2004**, 101, 308.
- [85] H. Petach, R. Ostroff, C. Greef, G. M. Husar, *Methods Mol. Biol.* **2004**, 264, 101.
- [86] H. Petach, L. Gold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 309.
- [87] B. R. Baker, R. Y. Lai, M. S. Wood, E. H. Doctor, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3138.
- [88] M. Eisenstein, *Nat. Methods* **2006**, 3, 244.
- [89] R. Kirby, E. J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y. S. Park, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, A. D. Ellington, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4066.
- [90] R. Y. Lai, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 229.
- [91] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5456.
- [92] I. Willner, M. Zayats, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6528; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6408.
- [93] C. Bock, M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, D. Zichi, *Proteomics* **2004**, 4, 609.
- [94] R. Nutiu, J. M. Yu, Y. Li, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1139.
- [95] R. Nutiu, Y. Li, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1868.
- [96] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, 287, 820.
- [97] Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof, M. Famulok, *Science* **1996**, 272, 1343.
- [98] D. W. Drolet, L. Moon-McDermott, T. S. Romig, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1021.
- [99] C. S. Ferreira, K. Papamichael, G. Guilbault, T. Schwarzacher, J. Gariepy, S. Missailidis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 1039.
- [100] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 110e.
- [101] H. Zhang, X. F. Li, X. C. Le, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 34.
- [102] Y. F. Huang, H. T. Chang, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 567.
- [103] J. Charlton, J. Sennello, D. Smith, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 809.
- [104] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grossot, E. Peyrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8672.
- [105] E. N. Brody, M. C. Willis, J. D. Smith, S. Jayasena, D. Zichi, L. Gold, *Mol. Diagn.* **1999**, 4, 381.
- [106] B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kunkis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10113.
- [107] D. A. Di Giusto, W. A. Wlassoff, J. J. Gooding, B. A. Messerle, G. C. King, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, e64.
- [108] H. Zhang, Z. Wang, X. F. Li, X. C. Le, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1576.
- [109] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 473.
- [110] S. M. Gustafsdottir, S. Wennstrom, S. Fredriksson, E. Schallmeiner, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, U. Landegren, *Clin. Chem.* **2008**, 54, 1218.
- [111] V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P. W. Kantoff, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Lett.* **2007**, 7, 3065.
- [112] J. A. Hansen, J. Wang, A. N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2228.
- [113] M. Levy, S. F. Cater, A. D. Ellington, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2163.
- [114] J. Liu, J. H. Lee, Y. Lu, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4120.
- [115] M. N. Stojanovic, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9678.
- [116] A. P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, 7, 55.
- [117] S. Dwarakanath, J. G. Bruno, A. Shastry, T. Phillips, A. A. John, A. Kumar, L. D. Stephenson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 325, 739.
- [118] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, 355, 564.
- [119] J. Liu, Y. Lu, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 246.
- [120] J. Liu, D. Mazumdar, Y. Lu, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 8123; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7955.
- [121] M. Famulok, G. Mayer, *Nature* **2006**, 439, 666.
- [122] V. Bagalkot, O. C. Farokhzad, R. Langer, S. Jon, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 8329; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 8149.
- [123] X. Chen, Y. Deng, Y. Lin, D. Pang, H. Qing, F. Qu, H. Xie, *Nanotechnology* **2008**, 19, 235105.
- [124] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, 62, 4029.
- [125] O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T. N. Tran, D. A. Lavan, R. Langer, *Cancer Res.* **2004**, 64, 7668.
- [126] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 6315.
- [127] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Biomaterials* **2007**, 28, 869.
- [128] J. O. McNamara, II, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1005.
- [129] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, e73.
- [130] T. C. Chu, J. W. Marks, III, L. A. Lavery, S. Faulkner, M. G. Rosenblum, A. D. Ellington, M. Levy, *Cancer Res.* **2006**, 66, 5989.
- [131] M. V. Hosur, B. Nair, P. Satyamurthy, S. Misquith, A. Surolia, K. K. Kannan, *J. Mol. Biol.* **1995**, 250, 368.
- [132] J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2008**, 16, 1481.
- [133] J. Mi, X. Zhang, P. H. Giangrande, J. O. McNamara, II, S. M. Nimjee, S. Sarraf-Yazdi, B. A. Sullenger, B. M. Clary, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 956.
- [134] Z. Huang, W. Pei, S. Jayaseelan, H. Shi, L. Niu, *Biochemistry* **2007**, 46, 12648.
- [135] F. Chauveau, Y. Aissouni, J. Hamm, H. Boutin, D. Libri, F. Duconge, B. Tavitian, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 6119.

- [136] C. H. Chen, G. A. Chernis, V. Q. Hoang, R. Landgraf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9226.
- [137] Y. Hui, L. Shan, Z. Lin-Fu, Z. Jian-Hua, *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *306*, 71.
- [138] J. A. Phillips, D. Lopez-Colon, Z. Zhu, Y. Xu, W. Tan, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *621*, 101.
- [139] S. M. Shamah, J. M. Healy, S. T. Cload, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 130.
- [140] M. C. Alliegro, M. A. Alliegro, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19037.
- [141] M. C. Alliegro, *Cell Biol. Int.* **2001**, *25*, 577.
- [142] D. A. Daniels, H. Chen, B. J. Hicke, K. M. Swiderek, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15416.
- [143] J. G. Bruno, J. L. Kiel, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 457.
- [144] F. Chen, J. Zhou, F. Luo, A. B. Mohammed, X. L. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *357*, 743.
- [145] M. Homann, M. Lorger, M. Engstler, M. Zacharias, H. U. Goringer, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 491.
- [146] M. Homann, H. U. Goringer, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2571.
- [147] L. Cerchia, F. Duconge, C. Pestourie, J. Boulay, Y. Aissouni, K. Gombert, B. Tavitian, V. de Franciscis, D. Libri, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e123.
- [148] M. S. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190.
- [149] M. V. Berezovski, M. Lechmann, M. U. Musheev, T. W. Mak, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9137.
- [150] H. W. Chen, C. D. Medley, K. Sefah, D. Shangguan, Z. Tang, L. Meng, J. E. Smith, W. Tan, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 991.
- [151] D. Shangguan, Y. Li, Z. Tang, Z. C. Cao, H. W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C. J. Yang, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11838.
- [152] D. Shangguan, L. Meng, Z. C. Cao, Z. Xiao, X. Fang, Y. Li, D. Cardona, R. P. Witek, C. Liu, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 721.
- [153] Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikaratchy, H. W. Chen, Y. Li, W. Tan, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4900.
- [154] D. Shangguan, Z. C. Cao, Y. Li, W. Tan, *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 1153.
- [155] P. Mallikaratchy, Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan, W. Tan, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2230.
- [156] D. Shangguan, Z. Cao, L. Meng, P. Mallikaratchy, K. Sefah, H. Wang, Y. Li, W. Tan, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2133.
- [157] S. Fitter, R. James, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34193.
- [158] J. M. Layzer, B. A. Sullenger, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 1.
- [159] K. Guo, H. P. Wendel, L. Scheideler, G. Ziemer, A. M. Scheule, *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 731.
- [160] K. T. Guo, R. Schäfer, A. Paul, A. Gerber, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Stem Cells* **2006**, *24*, 2220.
- [161] K. T. Guo, D. Scharnweber, B. Schwenzer, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Biomaterials* **2007**, *28*, 468.
- [162] J. Hoffmann, A. Paul, M. Harwardt, J. Groll, T. Reeswinkel, D. Klee, M. Möller, H. Fischer, T. Walker, T. Greiner, G. Ziemer, H. P. Wendel, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *84*, 614.
- [163] R. Schäfer, J. Wiskirchen, K. Guo, B. Neumann, R. Kehlbach, J. Pintaske, V. Voth, T. Walker, A. M. Scheule, T. O. Greiner, U. Hermanutz-Klein, C. D. Claussen, H. Northoff, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Rofo* **2007**, *179*, 1009.
- [164] G. Mayer, M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4961.
- [165] J. Mi, X. Zhang, Y. Liu, S. K. Reddy, Z. N. Rabbani, B. A. Sullenger, B. M. Clary, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *359*, 475.
- [166] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715.
- [167] T. G. McCauley, J. C. Kurz, P. G. Merlino, S. D. Lewis, M. Gilbert, D. M. Epstein, H. N. Marsh, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 303.
- [168] J. M. Healy, S. D. Lewis, M. Kurz, R. M. Boomer, K. M. Thompson, C. Wilson, T. G. McCauley, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 2234.
- [169] R. E. Martell, J. R. Nevins, B. A. Sullenger, *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 30.
- [170] H. K. Lee, H. Y. Kwak, J. Hur, I. A. Kim, J. S. Yang, M. W. Park, J. Yu, S. Jeong, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9315.
- [171] K. H. Choi, M. W. Park, S. Y. Lee, M. Y. Jeon, M. Y. Kim, H. K. Lee, J. Yu, H. J. Kim, K. Han, H. Lee, K. Park, W. J. Park, S. Jeong, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2428.
- [172] H. K. Lee, Y. S. Choi, Y. A. Park, S. Jeong, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10560.
- [173] J. Konig, C. Julius, S. Baumann, M. Homann, H. U. Goringer, M. Feldbrugge, *Rna* **2007**, *13*, 614.
- [174] L. A. Cassiday, L. J. Maher, III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3930.
- [175] C. Lorenz, N. Piganeau, R. Schroeder, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 334.
- [176] N. Piganeau, U. E. Schauer, R. Schroeder, *RNA* **2006**, *12*, 177.
- [177] N. Piganeau, R. Schroeder, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 689.
- [178] M. G. Theis, A. Knorre, B. Kellersch, J. Moelleken, F. Wieland, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11221.
- [179] H. Shi, B. E. Hoffman, J. T. Lis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10033.
- [180] M. Blind, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3606.
- [181] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149.
- [182] A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougerolles, J. R. Dorkin, K. Narayananair Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Koteliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K. G. Rajeev, D. W. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H. P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561.
- [183] R. Rennert, I. Neundorf, A. G. Beck-Sickinger, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 485.
- [184] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173.
- [185] P. Kumar, H. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, *448*, 39.
- [186] E. Anderson, Q. Boese, A. Khvorova, J. Karpilow, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *442*, 45.
- [187] Y. Fedorov, E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall, A. Khvorova, *RNA* **2006**, *12*, 1188.
- [188] T. Mori, A. Oguro, T. Ohtsu, Y. Nakamura, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6120.
- [189] J. Mi, X. Zhang, Z. N. Rabbani, Y. Liu, S. K. Reddy, Z. Su, F. K. Salahuddin, K. Viles, P. H. Giangrande, M. W. Dewhirst, B. A. Sullenger, C. D. Kontos, B. M. Clary, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 66.
- [190] J. Mi, X. Zhang, Z. N. Rabbani, Y. Liu, Z. Su, Z. Vujaskovic, C. D. Kontos, B. A. Sullenger, B. M. Clary, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3577.
- [191] R. Chan, M. Gilbert, K. M. Thompson, H. N. Marsh, D. M. Epstein, P. S. Pendergrast, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e36.

- [192] V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J. O. Trent, P. J. Bates, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2097.
- [193] C. R. Ireson, L. R. Kelland, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2957.
- [194] Y. Teng, A. C. Girvan, L. K. Casson, W. M. Pierce, Jr., M. Qian, S. D. Thomas, P. J. Bates, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10491.
- [195] A. C. Girvan, Y. Teng, L. K. Casson, S. D. Thomas, S. Juliger, M. W. Ball, J. B. Klein, W. M. Pierce, Jr., S. S. Barve, P. J. Bates, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1790.
- [196] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck, D. J. Fernandes, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2358.
- [197] L. S. Green, C. Bell, N. Janjic, *Biotechniques* **2001**, *30*, 1094.
- [198] J. Floege, T. Ostendorf, U. Janssen, M. Burg, H. H. Radeke, C. Vargeese, S. C. Gill, L. S. Green, N. Janjic, *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 169.
- [199] J. S. Hartig, S. H. Najafi-Shoushtari, I. Grune, A. Yan, A. D. Ellington, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 717.
- [200] J. S. Hartig, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4263.
- [201] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3584.
- [202] A. Jenne, J. S. Hartig, N. Piganeau, A. Tauer, D. A. Samarsky, M. R. Green, J. Davies, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 56.
- [203] S. Yamazaki, L. Tan, G. Mayer, J. S. Hartig, J. N. Song, S. Reuter, T. Restle, S. D. Laufer, D. Grohmann, H. G. Krausslich, J. Bajorath, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 804.
- [204] M. Wieland, J. S. Hartig, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2643; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2604.
- [205] M. Wieland, J. S. Hartig, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1873.
- [206] B. Suess, J. E. Weigand, *RNA Biol.* **2008**, *5*, 24.
- [207] T. S. Bayer, C. D. Smolke, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 337.
- [208] M. Hafner, E. Vianini, B. Albertoni, L. Marchetti, I. Grune, C. Gloeckner, M. Famulok, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 579.
- [209] G. Mayer, M. Famulok, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 602.
- [210] M. Hafner, A. Schmitz, I. Grune, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, *Nature* **2006**, *444*, 941.
- [211] B. Fuss, T. Becker, I. Zinke, M. Hoch, *Nature* **2006**, *444*, 945.
- [212] N. H. Elowe, R. Nutiu, A. Allali-Hassani, J. D. Cechetto, D. W. Hughes, Y. Li, E. D. Brown, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5648.
- [213] J. Srinivasan, S. T. Cload, N. Hamaguchi, J. Kurz, S. Keene, M. Kurz, R. M. Boomer, J. Blanchard, D. Epstein, C. Wilson, J. L. Diener, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 499.
- [214] P. Porschewski, M. A. Grattinger, K. Klenzke, A. Erpenbach, M. R. Blind, F. Schafer, *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 773.
- [215] G. Mayer, A. Jenne, *BioDrugs* **2004**, *18*, 351.
- [216] W. G. Purschke, D. Eulberg, K. Buchner, S. Vonhoff, S. Klussmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5173.
- [217] A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 130e.
- [218] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, R. A. Harrington, B. A. Sullenger, *Trends Cardiovasc. Med.* **2005**, *15*, 41.
- [219] A. DeAnda, Jr., S. E. Coutre, M. R. Moon, C. M. Vial, L. C. Griffin, V. S. Law, M. Komeda, L. L. Leung, D. C. Miller, *Ann. Thorac. Surg.* **1994**, *58*, 344.
- [220] A. Joachimi, G. Mayer, J. S. Hartig, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3036.
- [221] Archemix; http://www.archemix.com/website/_popup_press_release.php?release=17, Pressemitteilung.
- [222] J. Müller, B. Wulffen, B. Potzsch, G. Mayer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2223.
- [223] Y. Kim, Z. Cao, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5664.
- [224] J. Müller, D. Freitag, B. Potzsch, G. Mayer, *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 2105.
- [225] C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, Jr., E. Scardino, W. P. Fay, B. A. Sullenger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1423.
- [226] S. M. Nimjee, J. R. Keys, G. A. Pitoc, G. Quick, C. P. Rusconi, B. A. Sullenger, *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 408.
- [227] C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortel, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90.
- [228] C. K. Dyke, S. R. Steinhubl, N. S. Kleiman, R. O. Cannon, L. G. Aberle, M. Lin, S. K. Myles, C. Melloni, R. A. Harrington, J. H. Alexander, R. C. Becker, C. P. Rusconi, *Circulation* **2006**, *114*, 2490.
- [229] M. Y. Chan, M. G. Cohen, C. K. Dyke, S. K. Myles, L. G. Aberle, M. Lin, J. Walder, S. R. Steinhubl, I. C. Gilchrist, N. S. Kleiman, D. A. Vorchheimer, N. Chronos, C. Melloni, J. H. Alexander, R. A. Harrington, R. M. Tonkens, R. C. Becker, C. P. Rusconi, *Circulation* **2008**, *117*, 2865.
- [230] M. Y. Chan, C. P. Rusconi, J. H. Alexander, R. M. Tonkens, R. A. Harrington, R. C. Becker, *J. Thromb. Haemostasis* **2008**, *6*, 789.
- [231] J. C. Gilbert, T. DeFeo-Fraulini, R. M. Hutabarat, C. J. Horvath, P. G. Merlini, H. N. Marsh, J. M. Healy, S. Boufakhreddine, T. V. Holohan, R. G. Schaub, *Circulation* **2007**, *116*, 2678.
- [232] S. Oney, S. M. Nimjee, J. Layzer, N. Que-Gewirth, D. Ginsburg, R. C. Becker, G. Arepally, B. A. Sullenger, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 265.
- [233] R. S. Apte, *Expert Opin. Pharmacother.* **2008**, *9*, 499.
- [234] W. E. Smiddy, *Ophthalmology* **2007**, *114*, 847.
- [235] S. S. Lynch, C. M. Cheng, *Ann. Pharmacother.* **2007**, *41*, 614.
- [236] P. J. Rosenfeld, D. M. Brown, J. S. Heier, D. S. Boyer, P. K. Kaiser, C. Y. Chung, R. Y. Kim, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1419.
- [237] J. O. McNamara, D. Kolonias, F. Pastor, R. S. Mittler, L. Chen, P. H. Giangrande, B. Sullenger, E. Gilboa, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 376.
- [238] I. Melero, W. W. Shuford, S. A. Newby, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, K. E. Hellstrom, R. S. Mittler, L. Chen, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 682.
- [239] C. M. Dollins, S. Nair, D. Boczkowski, J. Lee, J. M. Layzer, E. Gilboa, B. A. Sullenger, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 675.
- [240] J. Wang, H. Takeuchi, Y. Sonobe, S. Jin, T. Mizuno, S. Miyakawa, M. Fujiwara, Y. Nakamura, T. Kato, H. Muramatsu, T. Muramatsu, A. Suzumura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3915.
- [241] A. C. Gavin, M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, G. Superti-Furga, *Nature* **2002**, *415*, 141.
- [242] A. C. Gavin, G. Superti-Furga, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 21.
- [243] W. A. Weiss, S. S. Taylor, K. M. Shokat, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 739.
- [244] M. Blind (NascaCell Technologies AG), persönliche Mitteilung.