

# Aptameer-gebaseerde radiofarmaca: identificatie en karakterisatie van aptameren tegen HER2+ borstkanker

Faculteit Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige Wetenschappen  
Onderwijscommissie Biomedische Wetenschappen

Projectvoorstel voorgelegd tot het behalen van de graad van  
**Master in de Biomedische Wetenschappen**

**Ilse Luyckx**

10 januari 2013

Academiejaar 2012-2013

SCK•CEN promotor: Dr. An Aerts

UA promotor: Prof. Sylvia Dewilde

SCK•CEN begeleiders: Dr. An Aerts, Dr. Nathalie Impens, Drs. Marlies Gijs

Studiecentrum voor kernenergie (SCK•CEN)

Instituut voor milieu, gezondheid en veiligheid

Expertisegroep voor moleculaire en cellulaire biologie

Eenheid radiobiologie

Boeretang 200

2400 Mol



## Inhoudstafel

<b>Afkortingenlijst</b> .....	<b>ii</b>
<b>Inleiding</b> .....	<b>1</b>
<i>I. SCK•CEN</i> .....	1
<i>II. Radiofarmaca</i> .....	2
Doelwit: HER2+ borstkanker .....	2
Radionuclide.....	2
Vectormolecule: aptameren .....	3
<i>III. SELEX proces</i> .....	4
1. Library.....	4
a. DNA library .....	4
b. RNA library .....	5
2. Selectie .....	5
a. Proteïne SELEX .....	5
b. Cel SELEX .....	5
c. Cross-over SELEX .....	6
3. Amplificatie.....	6
4. Identificatie en karakterisatie .....	6
a. Sequentie analyseren .....	7
b. Structuur analyseren .....	7
c. Affiniteit, specificiteit en internaliserend karakter .....	7
<b>SCK•CEN selecteert, in samenwerking met de Universiteit van Leeds, internaliserende RNA aptameren tegen HER2+ borstkanker met behulp van cross-over SELEX</b> .....	<b>7</b>
<b>Methoden</b> .....	<b>8</b>
<i>I. Celcultuur</i> .....	8
<i>II. Synthese van aptameren</i> .....	8
<i>III. Chemische toxiciteit van natuurlijk Ga en Zn</i> .....	9
<i>IV. Affiniteit en specificiteit: binding aptameer – doelwit</i> .....	9
<i>V. Internaliserend karakter</i> .....	10
<i>VI. Statistische analyse</i> .....	10
<b>Referenties</b> .....	<b>I</b>
<b>Bijlagen</b> .....	<b>IV</b>

## Afkortingenlijst

cDNA	Complementair DNA	kEV	Kilo-elektronvolt
CT	<i>Computed</i> Tomografie	K <sub>D</sub>	Dissociatieconstante
Da	Dalton	LDH	Lactaat Dehydrogenase
dsDNA	Dubbelstrengig DNA	M	Molair
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	Nt	Nucleotiden
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	PCR	Polymerase-kettingreactie
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur	PEG	Polyethyleenglycol
EGFR	Epidermale Groeifactor Receptor	PET	Positron Emissie Tomografie
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
FACS	Fluorescentie geactiveerde celsortering	PI	Propidium-jodide
FITC	Fluoresceïne isothiocyanaat	RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase- PCR</i>
FS	Fosfatidylserine	SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
HER	Humane Epidermale Groeifactor Receptor	ssDNA	Enkelstrengig DNA
		XTT	<i>2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt</i>

# Inleiding

## I. SCK•CEN

In 1952 is het Studiecentrum voor Kernenergie, SCK•CEN, opgericht als excellentiecentrum rond het in stand houden van nucleaire wetenschap en technologie en stralingen (<http://www.sckcen.be/nl>). Het onderzoek geeft sinds 1991 voorrang aan thema's die nu en in de toekomst van maatschappelijk belang zijn zoals veiligheid van nucleaire installaties, stralingsbescherming, veilig beheer, opslag van radioactief afval (SCK•CEN Studiecentrum voor Kernenergie, 2010), verhinderen van ongecontroleerde proliferatie van splijtbare materialen, opleiding en training. De vele onderzoeksactiviteiten worden uitgevoerd in een competent instituut, waarin telkens een specifiek domein van nucleaire toepassing wordt bestudeerd: Nucleaire Materiaalwetenschappen (NMS), Geavanceerde Nucleaire Systemen (ANS) en Milieu, Gezondheid en Veiligheid (EHS). Deze drie wetenschappelijke instituten worden ondersteund door het instituut voor Communicatie, Algemene Diensten en Administratie (CSA). SCK•CEN telt ongeveer 700 werknemers en is één van de grootste onderzoekscentra in België (<http://www.sckcen.be/nl>).

Het instituut EHS verricht onderzoek naar nucleaire veiligheid, afvalbeheer, bescherming van mens en milieu, beheer van splijtstoffen en andere strategische materialen en maatschappelijke en ethische implicaties van nucleaire technologieën. Dit instituut is op nationaal en internationaal niveau betrokken in deze onderzoeksdomeinen (SCK•CEN Instituut voor Milieu, Gezondheid en Veiligheid, 2010). Eén van de expertisegroepen binnen EHS is Moleculaire en cellulaire biologie, die de eenheden Micro- en Radiobiologie omvat. De eenheid Radiobiologie bestudeert de wetenschappelijke basis van stralingsbescherming, radiotherapie en nucleaire geneeskunde. In stralingsbescherming is het doel om effecten van ioniserende straling op cellulair en moleculair niveau te begrijpen, en bijgevolg ook de gezondheidseffecten voor het organisme. Daarom draagt dit multidisciplinair onderzoek in belangrijke mate bij tot de gezondheid van de bevolking. De belangrijkste onderzoekslijnen zijn (1) de individuele stralingsgevoeligheid en het risico op kanker, (2) de invloed van ioniserende straling op vrouwelijke geslachtscellen, op de ontwikkeling van embryo en de hersenen, (3) de gezondheidseffecten van kosmische straling en gewichtloosheid in de ruimte en (4) de biologische effecten van radioactieve stoffen en ioniserende straling in radiotherapie en medische beeldvorming (SCK•CEN Radiobiologie, 2010).

Het CATAMARAN (*Cancer Targeting Molecules Attached to Radionuclides*) project is een activiteit van de eenheid radiobiologie. Het doel is om radiofarmaca te ontwikkelen voor doelgerichte kankertherapieën en –diagnose in de preklinische fase. Een radiofarmacon bestaat uit een vectormolecule, dat specifiek ontworpen is om te interageren met een kanker-gerelateerd doelwit, en een radionuclide. Afhankelijk van de eigenschappen van deze radionuclide worden de tumorcellen gedood en/of gevisualiseerd via ioniserende straling. De eerste pijler van het CATAMARAN project focust zich op *nanobodies* als vectormolecule. *Nanobodies* zijn de kleinst mogelijke volledig functionele antigeen-bindende fragmenten afgeleid van kameelantilichamen. Door hun hoge affiniteit en kleine omvang kunnen deze moleculen, als een geschikt radionuclide eraan gekoppeld is, tot snelle en specifieke visualisatie en inhibitie van moeilijk bereikbare kankers leiden. Zo kunnen de *in vivo* karakteristieken van *nanobodies* gelabeld aan lutetium-177 via verschillende chelatoren bestudeerd worden (D'Huyvetter et al, 2012). In de tweede pijler van het CATAMARAN project worden aptameren als vectormolecule gebruikt. Aptameren zijn synthetische, niet-coderende DNA of RNA oligonucleotiden die opvouwen tot een unieke 3D-structuur door intramoleculaire bindingen. Deze specifieke conformatie kan leiden tot binding met een kanker-specifiek doelwit met hoge specificiteit en affiniteit. Idealiter beïnvloeden de aptameren bovendien, na binding met hun doelwit, cellulaire processen die de kankerontwikkeling inhiberen (Gijs, 2011). Momenteel zijn al een serie RNA aptameren tegen HER2+ borstkankercellen geselecteerd met behulp van een specifiek

selectieproces, namelijk *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX).

## Doelstelling

Mijn masterthesis is gericht op het karakteriseren van aptameren *in vitro* wat betreft affiniteit, specificiteit en cel-internaliserend karakter om een verdere selectie te maken voor de koppeling met onder meer het radionuclide gallium-68. Daarom zal eveneens de chemische toxiciteit van natuurlijk gallium bestudeerd worden. Bovendien vervalt gallium-68 naar zink-68, waardoor ook de chemische toxiciteit van natuurlijk zink bepaald wordt.

## II. Radiofarmaca

Radiofarmaca bestaan dikwijls uit een vectormolecule en een radionuclide. De vectormolecule kan gericht zijn tegen een kanker-specifiek eiwit en brengt het radionuclide in de nabijheid van de kanker, dewelke dan, afhankelijk van de eigenschappen van de ioniserende stralingen, gevisualiseerd en/of geïnhibeerd wordt (Zimmermann, 2007). Doelgerichte beeldvormingstechniek door middel van radiofarmaca laat vroegtijdige diagnose en opvolging van therapieën toe. Ook kan het moleculaire karakter van de kanker geïdentificeerd worden. Hierdoor kunnen patiënten, die baat hebben bij een specifiek geneesmiddel, geselecteerd worden (Shangguan et al, 2006). Bovendien bieden radiofarmaca een mogelijkheid tot doelgerichte therapie voor inwendig gebruik. Neveneffecten van chemotherapie en uitwendige straling worden aanzienlijke gereduceerd aangezien deze techniek een onderscheid kan maken tussen gezonde en niet-gezonde cellen (Ting et al, 2010). Hieronder worden drie essentiële elementen van radiofarmaca verder besproken namelijk, doelwit, radionuclide en vectormolecule.

### Doelwit: HER2+ borstkanker

De mortaliteit bij vrouwen met agressieve borstkanker is nog steeds hoog (Thiel et al, 2012). Dit agressief gedrag wordt veroorzaakt door de overexpressie van de humane epidermale groeifactor receptor 2 (HER2) (Thiel et al, 2012). HER2 behoort tot de epidermale groeifactor receptor (EGFR) familie en telt vier leden (HER1, HER2, HER3 en HER4) (figuur 1, bijlage) (Thiel et al, 2012). In 20-30% van alle borstkankers wordt een overexpressie van HER2 waargenomen (Kim and Jeong, 2011).

De leden van de EGFR familie zijn tyrosine kinase receptoren met een gemeenschappelijke structuur: een extracellulair domein, waar ligand binding en dimerisatie plaatsvindt, een membraanoverbruggend domein en een intracellulair domein met een tyrosine kinase activiteit. De signaaltransductie begint met binding van ligand aan receptor. De receptor homo- of heterodimeriseert om vervolgens de intracellulaire tyrosine domeinen te cross-fosforyleren, waardoor de cascade opgang wordt getrokken (Alberts, 2008). Uiteindelijk kunnen specifieke intracellulaire processen aangesproken worden om celgroei, celdifferentiatie en celmigratie van de kanker te promoten.

Momenteel worden patiënten met HER2+ borstkanker behandeld met herceptine. Dit geneesmiddel is een monoklonaal antilichaam gericht tegen het extracellulair domein van HER2. Toch zijn vele patiënten ongevoelig aan deze therapie of ontwikkelen resistentie. Daarom is de nood aan nieuwe doelgerichte therapeutische middelen hoog (Thiel et al, 2012). Niet alleen borstkanker maar ook sommige vormen van eierstok-, maag-, blaas-, speekselklier- en longkanker worden gelinkt aan een verhoogde expressie van HER2 (Kim and Jeong, 2011). Vandaar vormt HER2 een ideale kandidaat voor de ontwikkeling van farmaca voor doelgerichte therapie (Thiel et al, 2012) en beeldvorming (Breeman et al, 2011).

### Radionuclide

Radionucliden zijn atomen waarvan de kernen onstabiel zijn. De kernen zenden straling of deeltjes uit ter vorming van een dochterisotoop, dat op zich ook radioactief kan zijn en verder vervalt, of

vervalt rechtstreeks tot een stabiel isotoop. Isotopen kunnen allerlei soorten straling uitzenden zoals, alfa deeltjes, negatief en positief geladen bèta deeltjes en gammastraling. Alfa-deeltjes worden uitgezonden wanneer de afstotende kracht tussen de vele protonen zeer groot is. Het zijn heliumkernen en bevatten daarom 2 neutronen en 2 protonen. Een negatief geladen bèta deeltje of elektron wordt uitgestraald wanneer in de kern een neutron in een proton overgaat, terwijl bij kernen die positief geladen bèta deeltjes of positronen uitzenden een proton in een neutron wordt omgevormd. Gammastraling zijn fotonen en bezitten geen lading of massa (Zimmermann, 2007).

In het CATAMARAN project zullen aptameren gekoppeld worden aan het radionuclide gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ). Deze onstabiele kern zendt positronen uit om zijn stabiel afvalproduct zink te vormen (Magill, Karlsruhe Nuclide Chart). De halfwaardetijd van  $^{68}\text{Ga}$  is 1.12u. Het radioactief verval van  $^{68}\text{Ga}$  kan gevisualiseerd worden met de krachtige beeldvormingstechniek positron emissie tomografie (PET). De positronen fuseren met aanwezige elektronen waardoor twee gamma fotonen in tegenovergestelde richting ( $180^\circ$ ) ontstaan. Dit proces wordt annihilatie genoemd, waarbij elk foton een energie heeft van 511 keV. De fotonen worden vervolgens gedetecteerd en verwerkt om de plaats van annihilatie te lokaliseren (Zimmermann, 2007). Bovendien kan PET gecombineerd worden met *computed* tomografie (CT) om de anatomische lokalisatie beter te bepalen (Fazio et al, 2004). Daarnaast kan SCK•CEN, in samenwerking met de Universiteit van Luik (ULg), zelf  $^{68}\text{Ga}$  produceren met behulp van  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generatoren.

### **Vectormolecule: aptameren**

Het arsenaal van vectormoleculen voor radiofarmaca gaat van proteïnen (monoklonale antilichamen, antilichaam fragmenten en non-immunoglobuline eiwitten) tot peptiden, vitaminen en nucleïnezuren (aptameren en antisense RNA's). De tweede pijler van het CATAMARAN project focust zich op aptameren als vectormolecule. Aptameren zijn synthetische, niet-coderende, enkelstrengige DNA of RNA oligonucleotiden (20-100 nucleotiden (nt); 11-35 kDa) die opvouwen tot een unieke 3D-structuur door intramoleculaire bindingen (Cerchia and de Franciscis, 2010; Stoltenburg et al, 2007). Deze specifieke conformatie kan leiden tot een hoge affiniteit tussen aptameer en doelwit (Ye et al, 2012). DNA aptameren hebben een hogere chemische en thermodynamische stabiliteit en zijn goedkoper. Toch worden RNA aptameren hoofdzakelijk bestudeerd, omdat meer diverse structuren gevormd kunnen worden. Om deze reden kunnen RNA aptameren een hogere affiniteit en specificiteit voor hun doelwit bezitten (Ni et al, 2011).

Aptameren kunnen geselecteerd worden tegen allerlei mogelijke doelwitten gaande van kleine organische stoffen en grote moleculen tot zeer complexe structuren/eiwitten aanwezig op levende cellen (Mascini et al, 2012). Ook zijn moeilijk bereikbare epitopen van eiwitten toegankelijk omwille van hun kleine omvang (Cerchia and de Franciscis, 2010). Enerzijds kunnen hierdoor aptameren in de cel geraken door binding met een internaliserende doelwitreceptor (Dua et al, 2011). Anderzijds kunnen aptameren in een lipofiele omgeving gebracht worden om versmelting met het plasmamembraan te bevorderen en bijgevolg ook de kans op internalisatie te vergroten. Daarom zijn deze oligonucleotiden ook interessant als afleveringsvehikel (Mayer, 2009). Bovendien kunnen deze oligonucleotiden interfereren met de biologische functie van het doelwit door te binden aan het actieve centrum. Bij HER2+ borstkanker zullen aptameren idealiter de kankerontwikkeling inhiberen (Brody and Gold, 1999).

Aptameren worden met behulp van het SELEX proces (zie verder) *in vitro* geselecteerd tegen een mogelijk doelwit. De *in vitro* selectie laat toe om een hoge specificiteit tussen aptameer en doelwit te bekomen, waardoor een onderscheid kan gemaakt worden tussen sterk gerelateerde doelwitten. Bovendien is de synthese van deze moleculen accuraat, snel en goed reproduceerbaar, zodat *batch-to-batch* variaties tot een minimum herleid wordt (Ye et al, 2012). Aptameren hebben eveneens een zeer lage immunogeniciteit en kunnen daarom herhaaldelijk toegediend worden (Song et al, 2012).

Niet-gemodificeerde aptameren worden te snel geklaard door de nieren omwille van het lage moleculaire gewicht. Daarom kunnen aptameren geconjugeerd worden aan omvangrijke groepen zoals polyethyleenglycol (PEG) (Dua et al, 2011). Daarnaast moeten aptameren, en dan voornamelijk RNA aptameren, aangepast worden om weerstand te bieden aan ribonucleasen aanwezig in de bloedcirculatie (Cerchia and de Franciscis, 2010). De enzymen focussen voornamelijk op pyrimidines (uracil en cytosine) (Dua et al, 2011). De pyrimidines kunnen voldoende gestabiliseerd worden door op de 2'-plaats een fluor-, methoxy- of een amino- groep in te bouwen (Bunka and Stockley, 2006), dewelke preferentieel voor het SELEX proces uitgevoerd worden om bindingseigenschappen van de geselecteerde aptameren niet te beïnvloeden (Zhang et al, 2011).

### III. SELEX proces

Aptameren worden *in vitro* geselecteerd door middel van het *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment* (SELEX) proces (figuur 2, bijlage) (Ohuchi, 2012). Dit proces is een iteratieve methode van binding, scheiding en amplificatie om aptameren met de hoogste affiniteit voor het gewenste doelwitmolecule te selecteren (Bunka and Stockley, 2006). Als eerste stap wordt een library, dit is een random pool van enkelstrengige (ss) DNA of RNA moleculen, aangemaakt door chemische synthese om vervolgens deze oligonucleotiden te incuberen met het gewenste doelwit. De ongebonden fragmenten worden verwijderd en de gebonden sequenties opgevangen en geamplificeerd (Dua et al, 2011). De geselecteerde, geamplificeerde oligonucleotiden vormen de nieuwe, verrijkte pool, waarmee de cyclus herhaald kan worden (Stoltenburg et al, 2007). De cyclus wordt meestal 10 tot 15 keer doorlopen (Song et al, 2012), waarbij in het begin moleculen zonder affiniteit voor het doelwit geëlimineerd worden. Daarna zullen oligonucleotiden met elkaar in competitie treden, waardoor degenen met de hoogste affiniteit geselecteerd kunnen worden (Bunka and Stockley, 2006). Bijgevolg neemt de affiniteit van de oligonucleotiden pool tijdens de opeenvolgende cycli toe, tot alleen de sequenties met de sterkste affiniteit overblijven (Djordjevic, 2007). Nadien worden de geselecteerde aptameren geïdentificeerd en gekarakteriseerd om oligonucleotiden met de meest gunstige eigenschappen te weerhouden (Dua et al, 2011).

Het verloop van het SELEX proces is afhankelijk van het doelwit, de gebruikte oligonucleotide library, de scheidingsmethode, en de gewenste karakteristieken en applicaties van de te selecteren aptameren (Stoltenburg et al, 2007). Inderdaad, de SELEX procedure kent ondertussen al vele varianten. Zo richten sommige methoden zich op automatisatie en anderen op een verbeterde specificiteit of een betere scheiding (Mascini et al, 2012). Het algemeen principe van de procedure is echter hetzelfde. Hieronder worden de verschillende elementen van het proces in meer detail besproken.

#### 1. Library

Het SELEX proces start met de chemische synthese van een ssDNA library (Dua et al, 2011). Deze initiële DNA pool bestaat uit  $10^{15}$  tot  $10^{16}$  random ssDNA oligonucleotiden. Elke oligonucleotide bevat een centrale regio van random sequenties (20-80 nt, Stoltenburg et al, 2007) en constante sequenties (15-25 nt) aan het 5'- en 3'-uiteinde. Deze constante sequenties vormen aanhechtingsplaatsen voor de primers tijdens de amplificatie (Djordjevic, 2007). Hieronder is de library (figuur 3, bijlage) in meer detail besproken voor de selectie van respectievelijk DNA en RNA aptameren.

##### a. DNA library

De random pool van ssDNA kan in principe al direct gebruikt worden in het SELEX proces om DNA aptameren te selecteren. Toch wordt vaak verkozen om eerst een amplificatie met polymerase-kettingreactie (PCR) uit te voeren voor amplificatie van het startmateriaal. De DNA oligonucleotiden moeten na PCR enkelstrengig gemaakt worden om intramoleculaire bindingen te vormen met het doelwit. Streptavidine/biotine systemen kunnen in verschillende settings gebruikt worden om dubbelstrengige (ds) DNA te scheiden. Een

alternatieve techniek is asymmetrische PCR waarbij één primer of een zeer grote hoeveelheid van één primer gebruikt wordt om ssDNA producten te verkrijgen (Stoltenburg et al, 2007).

#### **b. RNA library**

Om RNA aptameren te selecteren moet de DNA library eerst omgezet worden in een RNA library. Het ssDNA wordt omgezet in dsDNA met behulp van een PCR amplificatie, en vervolgens *in vitro* overgeschreven in RNA door T7 RNA polymerase. T7 RNA polymerase bindt aan zijn promotorsequentie, dewelke geïncorporeerd is in de 5'-kant van de constante sequentie (Dua et al, 2011). Modificaties om resistentie te bieden aan RNasen of om het moleculair gewicht te laten toenemen, kunnen eveneens aangebracht worden om de stabiliteit van RNA aptameren in het lichaam te verbeteren (zie vectormolecule: aptameren) (Mayer, 2009).

## **2. Selectie**

De volgende stap in het SELEX proces is de selectie. De selectie omvat binding van doelwitmoleculen met de oligonucleotide library, de daaropvolgende scheiding tussen ongebonden en gebonden oligonucleotiden en uiteindelijk de elutie van de gebonden oligonucleotiden. Het is cruciaal om de scheiding van gebonden met ongebonden fractie zo efficiënt mogelijk uit te voeren. Hiervoor wordt het doelwit meestal geïmmobiliseerd. Het doelwit, waartegen geselecteerd wordt, kan een gezuiverd eiwit of volledig intacte cellen zijn en bepaalt mee de keuze van de scheidingstechniek (Stoltenburg et al, 2007). Hieronder is de indeling van mogelijke scheidingstechnieken gebaseerd op het type doelwit.

#### **a. Proteïne SELEX**

Bij een proteïne SELEX worden geïsoleerde eiwitten als doelwit gebruikt (Song et al, 2012). Deze eiwitten moeten hiervoor gezuiverd worden, waarvoor kennis over het doelwit en zijn eigenschappen vereist zijn. Bovendien kan de native conformatie gewijzigd worden tijdens het zuiveringsproces (Ye et al, 2012). Bij een proteïne SELEX kunnen onderstaande scheidingstechnieken toegepast worden.

Een affiniteitschromatografie scheidt oligonucleotiden op basis van hun affiniteit voor het doelwit. Het doelwit wordt gebonden aan geïmmobiliseerde agarose beads die de matrix van een kolom vormen. Nadien wordt de library toegevoegd waarbij de specifieke aptameren zullen binden (Stoltenburg et al, 2007). In tegenstelling tot affiniteitschromatografie bieden magnetische beads, waaraan het doelwit gebonden is, de mogelijkheid om de bindende sequenties te scheiden in oplossing door immobilisatie via een magneet (Song et al, 2012). Capillaire elektroforese is een andere scheidingstechniek waarbij een pool van DNA of RNA fragmenten gescheiden wordt op basis van lading, grootte en vorm (Experimentele Vaardigheden, Module 3). Het doelwit is hierbij niet geïmmobiliseerd maar migreert onder invloed van het elektrisch veld (Jing and Bowser, 2011).

#### **b. Cel SELEX**

Bij cel SELEX is het doelwit aanwezig op het oppervlakte van cellen. Hierdoor is kennis over het eiwit en zijn conformatie niet zozeer nodig. Doelwitten moeten bovendien geen zuivering ondergaan waardoor de kans op veranderingen in conformatie vermeden kan worden. Om deze redenen wordt het cel SELEX proces toegepast om aptameren te selecteren in hun natuurlijke context (Ye et al, 2012). Om een efficiëntere scheiding van de aptameren te bekomen worden de cellen eveneens geïmmobiliseerd. De meest gebruikte techniek is immobilisatie door middel van de adherente eigenschappen van de cellen (Shangguan et al, 2006). De ongebonden oligonucleotiden worden dan verwijderd door de cellen te wassen. Cellen zonder adherente eigenschappen kunnen in suspensie gekweekt worden, waarbij de ongebonden oligonucleotiden worden verwijderd door centrifugatie.



Een library van DNA of RNA moleculen wordt geïncubeerd met positieve cellen, dewelke het doelwit tot expressie brengen. Ongebonden oligonucleotiden worden verwijderd door wasstappen (adherente cellen) of door centrifugatie (cellen in suspensie). Deze selectie wordt een positieve selectie genoemd. Positieve cellen brengen niet alleen het doelwit tot expressie, maar eveneens andere structuren. Daarom wordt een bijkomende selectie uitgevoerd met negatieve cellen om de specificiteit te verhogen. Negatieve cellen hebben gelijkaardige oppervlakte moleculen, maar brengen het doelwit niet tot expressie. Hierdoor kan een negatieve selectie of 'counterselectie' uitgevoerd worden. Deze specifieke sequenties worden uiteraard uit de pool verwijderd (Shangguan et al, 2006).

Een nadeel bij cel SELEX wordt echter gevormd door de aanwezigheid van dode cellen. Dode cellen trekken niet-specifieke oligonucleotiden aan, waardoor geen goede selectie gemaakt kan worden. De geselecteerde pool bevat bijgevolg oligonucleotiden met en zonder affiniteit voor het doelwit. Bovendien kunnen niet-specifieke oligonucleotiden de pool domineren na het doorlopen van enkele cycli. Bij cellen in suspensie zal celschade en celdood sneller optreden doordat de ongebonden oligonucleotiden verwijderd worden door centrifugatie (Dua et al, 2011). Chelatoren zoals EDTA worden toegevoegd om enkel de specifieke oligonucleotiden te selecteren (Ohuchi, 2012). Een alternatief om contaminatie van dode cellen op te lossen is om fluorescentie geactiveerde celsortering (FACS)-SELEX te gebruiken. FACS kan een onderscheid maken tussen levende en dode cellen op basis van hun lichtverstrooiing, waardoor enkel gebonden oligonucleotiden op levende cellen geselecteerd worden en verder onderzocht kunnen worden (Dua et al, 2011). Het cel SELEX protocol is duidelijk complexer dan proteïne SELEX (Song et al, 2012).

### c. *Cross-over SELEX*

Het cross-over SELEX proces (figuur 4, bijlage) is een combinatiemethode van proteïne SELEX met cel SELEX. Cycli waarbij geselecteerd wordt tegen cellen worden afgewisseld met cycli waarin het doelwit gezuiverde eiwitten zijn (Cerchia and de Franciscis, 2010). Hierdoor bezitten de bekomen aptameren vaak betere eigenschappen in tegenstelling met oligonucleotiden geselecteerd tijdens een proteïne of cel SELEX proces (Hicke et al, 2006).

## 3. Amplificatie

De gebonden oligonucleotiden worden in deze stap van het SELEX proces geamplificeerd om de verrijkte pool voor de volgende selectieronde te vormen. Bij ssDNA kan direct een PCR uitgevoerd worden. Daarna wordt het DNA weerom enkelstrengig gemaakt aan hand van scheidingstechnieken (zie library). Bovendien kunnen primers, waaraan streptavidine/biotine, 2-fluoro of functionele groepen gekoppeld zijn, gebruikt worden om bepaalde modificaties aan te brengen. RNA oligonucleotiden moeten echter eerst omgezet worden in cDNA vooraleer een amplificatie kan uitgevoerd worden. Na amplificatie wordt het dsDNA weerom overgeschreven in RNA via het T7 RNA polymerase (Stoltenburg et al, 2007).

## 4. Identificatie en karakterisatie

Na het SELEX proces worden de geselecteerde aptameren gekloneerd, geïdentificeerd en verder gekarakteriseerd. De finale, geselecteerde pool van oligonucleotiden wordt eerst in een vector geligeerd en vervolgens getransformeerd in *E. coli* (Lauridsen et al, 2012). De bacteriën worden uitgeplaat en zullen kolonies vormen. De constructie van de vector laat maar ligatie van één aptameer toe. Bovendien wordt slechts één vector door één *E. coli* cel opgenomen. Kolonies representeren identieke cellen afkomstig van één vooroudercel en bevatten daarom één geselecteerde aptameer (Strachan, 2011). Uit de *E. coli* cellen wordt dan de vector geïsoleerd (Stoltenburg et al, 2007) of wordt een kolonie-PCR uitgevoerd om het gekloneerde aptameer te isoleren voor verdere analyse.

### a. *Sequentie analyseren*

De sequentie van de aptameren wordt bepaald om homologe sequenties te identificeren (Shangguan et al, 2006). Veelal worden internet programma's zoals CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) gebruikt om sequenties te aligneren en vervolgens te groeperen op basis van homologie. In sommige gevallen kunnen speciale sequentiepatronen of zeer geconserveerde regio's herkend worden om zo de aptameren te groeperen. Deze regio's zijn meestal betrokken bij de binding van het aptameer aan het doelwit (Stoltenburg et al, 2007).

### b. *Structuur analyseren*

Nadat de sequenties geanalyseerd zijn, wordt de structuur van de geselecteerde aptameren in meer detail bestudeerd. Een software programma, zoals mfold, berekent alle mogelijke 2D-conformaties en kent hieraan een energie-inhoud toe. Hierdoor kunnen de relevante structuren, die de interactie aangaan met het doelwit, gesuggereerd worden. Bovendien worden deze structuren binnen een groep met homologe sequenties vergeleken, zodat geconserveerde structuren geïdentificeerd kunnen worden (Stoltenburg et al, 2007). Eveneens wordt de grootte van de relevante structuur bekeken om daar waar mogelijk is de sequentie in te korten (Mascini et al, 2012). Softwareprogramma's die 3D-conformaties berekenen kunnen eveneens gebruikt worden om de structuur verder te analyseren.

### c. *Affiniteit, specificiteit en internaliserend karakter*

De flow cytometer kan gehanteerd worden om de affiniteit van individuele aptameren voor een doelwitmolecule op cellen of op beads te bestuderen. De geselecteerde individuele aptameren worden eerst gelabeld om vervolgens te incuberen met het doelwit in verschillende concentraties. De intensiteiten van fluorescentie worden in functie van de concentratie uitgezet om de bindingsaffiniteit (dissociatieconstante  $K_D$ ) te bepalen (Shangguan et al, 2006). Een lage dissociatieconstante (nM) is wenselijk, omdat dit een hoge affiniteit voor het doelwit betekent (Stoltenburg et al, 2007).

De specificiteit van de aptameren kan getest worden door de aptameren op hun  $K_D$  concentratie te incuberen met enerzijds cellijnen, waarbij een hoge expressie van een specifiek doelwit aanwezig is en anderzijds met cellijnen die het doelwit in lage hoeveelheden tot expressie brengt. De specificiteit kan eveneens aangetoond worden in een competitie-assay, waarbij commerciële beschikbare antilichamen in competitie treden met gelabelde aptameren voor binding (D'Huyvetter et al, 2011).

Het internaliserend karakter van aptameren kan onderzocht worden met flow cytometrie. Gelabelde aptameren worden eerst geïncubeerd met doelwitcellen en vervolgens behandeld met trypsine. Trypsine is een protease en vernietigt eiwitten aan het plasmamembraan, waardoor enkel internaliserende aptameren een fluorescentiesignaal weergeven (zie ook methode) (Xiao et al, 2012). De distributie van de fluorescentie kan ook bekeken worden onder een microscoop en geeft informatie over het internaliserend karakter van de aptameren (Shigdar et al, 2011).

## **SCK•CEN selecteert, in samenwerking met de Universiteit van Leeds, internaliserende RNA aptameren tegen HER2+ borstkanker met behulp van cross-over SELEX**

Initieel werd een ssDNA library gesynthetiseerd met een random sequentie van oligonucleotiden van 50-meer. Om RNA aptameren te selecteren werd de library overgeschreven in RNA, waarbij uracil en cytosine gemodificeerd zijn met een 2'-fluorogroep. In deze procedure werd tijdens de eerste 7 cycli geselecteerd tegen het gezuiverde eiwit. Eerst werd een negatieve selectie met behulp van HER3, en

nadien een positieve selectie tegen HER2 uitgevoerd. De gebonden en ongebonden sequenties werden telkens gescheiden door middel van magnetische beads. Vervolgens werden de weerhouden aptameren verder geamplificeerd en overgeschreven in RNA om de nieuwe, verrijkte pool te vormen. Tijdens de twee daaropvolgende cycli werd er geselecteerd tegen cellen, weerom eerst een negatieve selectie met MDA-MB-231 humane borstkankercellen (weinig HER2 expressie) en daarna een positieve selectie met SK-BR-3 humane borstkankercellen (overexpressie HER2). Deze cellijnen hebben adherente eigenschappen, waardoor de gewenste oligonucleotiden gescheiden kunnen worden tijdens het wassen. Na positieve incubatie werden de cellen getrypsiniseerd en ook gelyseerd om internaliserende aptameren op te zuiveren. Van cycli 9-13 werd terug geselecteerd tegen het eiwit, en cycli 14-15 weerom tegen de cellen. Bovendien werd tijdens de 15<sup>de</sup> cyclus FACS uitgevoerd, om de fluorescentie van de aanwezige aptameren te meten. Na elke cyclus werd een kleine hoeveelheid van de weerhouden pool bijgehouden om later de fluorescentie te meten. De intensiteit zou idealiter stijgen, aangezien na elke cyclus steeds meer bindende sequenties opgevangen en geamplificeerd werden.

## Methoden

Twee verschillende aptameren worden in deze masterthesis verder bestudeerd. Enerzijds heeft SCK•CEN, in samenwerking met de Universiteit van Leeds, internaliserende RNA aptameren geselecteerd volgens het hierboven beschreven proces. Deze worden verder *in vitro* gekarakteriseerd wat betreft affiniteit, specificiteit en cel-internaliserend karakter. Anderzijds wordt eveneens het DNA aptameer (HB5), geselecteerd door Liu en collega's (Liu et al, 2012), verder bestudeerd voor deze drie aspecten. Dit DNA aptameer is 86 nucleotiden lang en bezit een  $K_D$  van 18.9 nM voor HER2. Later zullen de meest gunstige aptameren aan gallium-68 gekoppeld worden, daarom zal eveneens de chemische toxiciteit van deze stof bepaald worden. Bovendien vervalt gallium-68 in zink-68, waardoor ook hiervan de chemische toxiciteit wordt bepaald.

### I. Celcultuur

De aptameren worden gekarakteriseerd wat betreft affiniteit en specificiteit (zie puntje IV) en internaliserend karakter (zie puntje V) door middel van humane cellijnen met adherente groei-eigenschappen: SK-OV-3, SK-BR-3 en MDA-MB-231 (ATCC). SK-OV-3 cellen zijn humane epitheliale kankercellen afkomstig van een eierstok adenocarcinoom met hoge expressie van HER2. De SK-BR-3 humane epitheliale kankercelijn is, daarentegen, afkomstig van een borst adenocarcinoom, maar brengen ook HER2 tot overexpressie. MDA-MB-231 cellen zijn humane epitheliale kankercellen afkomstig van een borst adenocarcinoom. Deze cellen brengen weinig HER2 tot expressie. Het cultuurmedium voor SK-OV-3 en SK-BR-3 cellijn is McCoy's 5A Medium (Gibco) en voor MDA-MB-231 is dit Leibovitz's L15 Medium (ATCC). De chemische toxiciteit wordt bepaald door middel van gezonde endotheliale hybride cellen namelijk EA.hy926 cellen (ATCC). De EA.hy926 cellen worden opgegroeid in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Alle cultuurmedia worden gesupplementeerd met 10% (v/v) FBS (Gibco) en 1% penicilline/streptomycine (Gibco) en geïncubeerd in een vochtige atmosfeer bij 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>.

De cellen worden eerst gewassen met PBS (Gibco), vervolgens losgemaakt met 5 mM trypsine-EDTA voor EA.hy926 cellen en 5 mM EDTA-PBS voor SK-OV-3 en MDA-MB-231 cellen (Gibco) en dan manueel geteld door middel van een bürker-telkamer (Mariënfeld).

### II. Synthese van aptameren

De reeds gekloneerde en geïdentificeerde RNA aptameren worden individueel in grote hoeveelheden aangemaakt met behulp van kolonie-PCR en vervolgens overgeschreven in RNA via *in vitro* transcriptie. Tijdens dit proces worden gemodificeerde nucleotiden aangeboden: 2'-fluor-dUTP en -dCTP (TriLink Biotechnology) en fluoresceïne-12-UTP (Roche). Het DNA aptameer, HB5, wordt eveneens in grote hoeveelheden aangemaakt met behulp van PCR, waarbij FITC-gelabelde 5' primers

en gebiotinyleerde 3' primers worden toegevoegd. De gebiotinyleerde primers laten scheiding van het dsDNA toe met behulp van streptavidine gecoate magnetische beads.

### III. Chemische toxiciteit van natuurlijk Ga en Zn

De chemische cytotoxiciteit van natuurlijk Ga en Zn kan aangetoond worden met behulp van flow cytometrie.

Flow cytometrie is een techniek waarbij afzonderlijke cellen of beads voorbij laser- en lichtbronnen passeren. Bij cellen wordt informatie over grootte en complexiteit gemeten door de respectievelijke voorwaartse en zijwaartse lichtverstrooiing. Daarnaast kunnen specifieke kenmerken gedetecteerd worden door te labelen met fluoroforen. De lichtverstrooiing- en/of fluorescentiesignalen afkomstig van de cellen of beads worden begeleid door optische filters naar de overeenkomstige detectoren, waar de signalen worden omgezet in elektrische pulsen. De computer zal vervolgens de elektrische pulsen omzetten in digitale data en weergeven in een scatter dot plot of histogram.

Aan de hand van verschillende concentraties (1 nM – 1  $\mu$ M, pH 7) van gallium(III)chloride en zink(II)chloride (Sigma-Aldrich) wordt de dosis die toxisch is voor 50% van de EA.hy926 cellen bepaald ( $IC_{50}$ ). Celdood wordt gemeten door apoptotische en necrotische cellen te tellen en te vergelijken met het aantal levende cellen. Apoptose wordt gekenmerkt door de flipflop van het fosfolipide fosfatidylserine (FS), waardoor FS extracellulair toegankelijk wordt. Annexine V bindt specifiek FS en zal na koppeling met het fluorofloor fluoresceïne isothiocyanaat (FITC; 495/521 nm) FS detecteren. Necrotische cellen vertonen daarentegen lekken in hun celmembraan, waardoor intercalerende fluoroforen zoals propidium-jodide (PI; 536/617 nm) de cel kunnen binnendringen en binden aan het DNA.

#### *Alternatieve methoden:*

Daarnaast kan eveneens fluorescentie microscopie toegepast worden om celdood kwalitatief te evalueren, waarbij dezelfde methode als hierboven wordt toegepast: FITC toont apoptotische cellen aan en PI kleurt necrotische cellen. Andere alternatieve methoden zijn commerciële toxiciteit-kits zoals XTT (Sigma-Aldrich), Trypan Blue (Sigma) en lactaat dehydrogenase (LDH) kit (Roche). De XTT gebaseerde kit is een spectrofotometrische methode om het aantal levende cellen te schatten op basis van mitochondriale hydrogenase activiteit. Mitochondriale hydrogenasen reduceren namelijk de tetrazoliumring van XTT, waardoor de initiële gele kleur verandert in oranje. De absorptie van de resulterende oranje oplossing wordt gemeten. De Trypan Blue methode daarentegen is gebaseerd op het principe waarbij dode cellen bepaalde kleurstoffen zoals trypaanblauw wel opnemen en levende cellen niet. Met behulp van een telkamer of spectrofotometer wordt de celviabiliteit bepaald. De LDH methode is een colorimetrische assay waarbij de vrijgestelde activiteit van LDH uit beschadigde cellen wordt gemeten. Het supernatans wordt daarom eerst gecollecteerd. De LDH activiteit wordt bepaald door een gekoppelde enzymatische reactie waarbij weerom de tetrazoliumring gereduceerd wordt tot formazan. Vervolgens wordt de hoeveelheid absorptie gemeten, die correleert met de hoeveelheid beschadigde cellen.

### IV. Affiniteit en specificiteit: binding aptameer – doelwit

De affiniteit en specificiteit van de aptameren voor het doelwit wordt aangetoond met behulp van flow cytometrie. Zo wordt de affiniteitsconstante berekend door verschillende concentraties van gelabelde aptameren te incuberen met het doelwit. Het doelwit kunnen de hierboven beschreven cellijnen zijn (SK-OV-3 of SK-BR-3 (HER2 expressie) en MDA-MB-231 (weinig HER2 expressie, negatieve controle). Daarnaast kunnen eveneens polystyreen beads gebruikt worden, waarbij de beads gecoat worden met de gezuiverde doelwitten HER2 en HER3 (negatieve controle). De gemiddelde intensiteiten van de fluorescent gelabelde aptameren gebonden aan hun doelwit worden uitgezet in functie van de concentratie om hieruit de  $K_D$  te berekenen. De specificiteit van de aptameren wordt getest door de aptameren op hun  $K_D$  concentratie te incuberen met andere cellijnen met hoge HER2 expressie (bv. SK-BR-3 cellen, SK-OV-3 cellen en LS174T cellen) en lage HER2

expressie (MCF7 cellen, SK-OV-3 cellen waarbij de HER2 expressie specifiek geïnhibeerd werd door middel van silencing). Daarnaast kan de specificiteit eveneens gedemonstreerd worden door een competitie-assay. Hierbij worden commerciële antilichamen gericht tegen het doelwit gebruikt. Deze antilichamen zullen tijdens de incubatieperiode met de doelwitten binden omwille van hun hoge affiniteit en specificiteit. Nadien worden hieraan gelabelde aptameren toegevoegd. Deze gelabelde aptameren kunnen niet meer specifiek binden omwille van de gebonden antilichamen, enkel specifieke bindingen kunnen gedetecteerd worden.

#### *Alternatieve methoden:*

Een alternatieve methode om binding tussen aptameer en opgezuiverd doelwit aan te tonen is *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Deze methode detecteert interacties tussen proteïnen en nucleïnezuren op basis van hun verschil in migratie. Het proteïne–nucleïnezuur complex heeft een hogere moleculaire massa en zal bijgevolg trager migreren tegenover het vrije proteïne of nucleïnezuur. Zowel proteïne als nucleïnezuur elektroforese experimenten kunnen de binding bevestigen (Gijs, 2011). De binding tussen aptameer en gezuiverd doelwit kan ook nog aangetoond worden door *Surface Plasmon Resonance* (SPR). SPR is een verschijnsel dat optreedt wanneer gepolariseerd licht invalt op een dunne (goud) metaallaag. In specifieke omstandigheden (polarisatie, golf lengte en resonantie invalshoek van de lichtbundel) kunnen vrije elektronen aan het metaaloppervlakte lichtfotonen absorberen en omzetten in oppervlaktegolven (=plasmonen). Hierdoor zal de intensiteit van de gereflecteerde lichtbundel afnemen. Bij deze methode wordt een ligand geïmmobiliseerd op een chip, die gecoat is met een goudlaagje. Vervolgens worden doelwitten toegevoegd, zodat bindingen kunnen plaatsvinden tussen ligand en doelwitten. De toegenomen massa leidt tot een verandering in resonantie-omstandigheden, en beïnvloedt bijgevolg de intensiteit van het te meten reflectiesignaal ter hoogte van de goudlaag. Deze chips zijn commercieel beschikbaar (Biacore). Het SPR principe kan eveneens aangetoond worden op een optische vezel (Lammertyn et al, 2009).

## **V. Internaliserend karakter**

Naast de affiniteit en specificiteit kan ook het internaliserend karakter van de aptameren onderzocht worden aan hand van flow cytometrie. De aptameren worden fluorescent gelabeld en samengebracht met de doelwitcellen. Vervolgens wordt trypsine toegevoegd. Trypsine vernietigt doelwitten aan het plasmamembraan, waardoor deze, samen met de eventuele gebonden aptameren, dissociëren van de cel. Enkel internaliserende aptameren blijven in de cel aanwezig en geven bijgevolg een fluorescentiesignaal. In een complementaire kwalitatieve test zal het internaliserend karakter van aptameren met behulp van fluorescentie microscopie bestudeerd worden.

#### *Alternatieve methode:*

Eveneens kan, na trypsine behandeling, een kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd worden om het internaliserend karakter van RNA aptameren aan te tonen. Hierbij wordt eerst het RNA, aanwezig in de cel, gezuiverd om dan te amplificeren. Een interne referentie controle wordt mee opgenomen in het protocol om de relatieve hoeveelheid te bepalen (Thiel et al, 2012).

## **VI. Statistische analyse**

De resultaten van de uitgevoerde experimenten zullen worden geanalyseerd met een t-test (Excel) of Anova (SPSS).

## Referenties

- Baselga, J., and Swain, S. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 463-475.
- Breeman, W., de Blois, E., Chan, H., Konijnenberg, M., Kwekkeboom, D., and Krenning, E. (2011). <sup>68</sup>Ga-labeled DOTA-Peptides and <sup>68</sup>Ga-labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Semin Nucl Med* 41, 314-321.
- Bunka, D., and Stockley, P. (2006). Aptamers come of age – at last. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 588-596.
- Brody, E., and Gold, L. (1999). Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology* 74, 5-13.
- Cerchia, L., and de Franciscis, V. (2010). Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends in Biotechnology* 28, 517-525.
- Djordjevic, M. (2007). SELEX experiments: New prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomolecular Engineering* 24, 179-189.
- Dua, P., Kim, S., and Lee, D-K. (2011). Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins. *Methods* 54, 215-225.
- D’Huyvetter, M., Aerts, A., Xavier, C., Vaneycken, I., Devoogdt, N., Gijs, M., Impens, N., Baatout, S., Ponsard, B., Muyldermans, S., Caveliers, V., and Lahoutte, T. (2012). Development of <sup>177</sup>Lu-nanobodies for radioimmunotherapy of HER2-positive breast cancer: evaluation of different bifunctional chelators. *Contrast Media Mol. Imaging* 7 (2), 254-264.
- D’huyvetter, M., Vaneycken, I., Hernot, S., De Vos, J., Xavier, C., Devoogdt, N., Caveliers, V., and Lahoutte, T. (2011). Immuno-imaging using nanobodies. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 877-881.
- Fazio, F., Gianolli, L., Landoni, C., Messa, C., Picchio, M., and Zangheri, B. (2004). PET/CT and breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (Suppl. 1), S135-S142.
- Gijs, M. (2011). Ontwikkeling van aptameer-gebaseerde radiofarmaca: cytotoxiciteit, specificiteit en labelling met koud lutetium. Masterthesis.
- Hicke, B., Stephens, A., Gould, T., Chang, Y-F., Lynott, C., Heil, J., Borkowski, S., Hilger, C-S., Cook, G., Warren, S., and Schmidt, P. (2006). Tumor Targeting by an Aptamer. *J Nucl Med* 47, 668-678.
- Jing, M., and Bowser, M. (2011). Isolation of DNA Aptamers Using Micro Free Flow Electrophoresis. *Lab Chip* 11 (21), 3703-3709.
- Kim, M., and Jeong, S. (2011). *In Vitro* Selection of RNA Aptamer and Specific Targeting of ErbB2 in Breast Cancer Cells. *Oligonucleotides* 3 (21), 1-6.
- Lammertyn, J., Pollet, J., Delpont, F., Janssen K., Jans, K., Maes, G., Pfeiffer, H., and Wevers, M. (2009). Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA-protein interactions. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 864-869.
- Lauridsen, L., Rothnagel, J., and Veedu, R. (2012). Enzymatic Recognition of 2'-Modified Ribonucleoside 5'-Triphosphates: Towards the Evolution of Versatile Aptamers. *ChemBioChem* 13, 19-25.

- Liu, Z., Duan, J-H., Song, Y-M., Ma, J., Wang, F-D., and Yang, X-D. (2012). Novel HER2 Aptamer Selectively Deliver Cytotoxic Drug to HER2-positive Breast Cancer Cells in Vitro. *Journal of Translational Medicine* 10 (148).
- Mascini, M., Palchetti, I., and Tombelli, S. (2012). Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 1316-1332.
- Mayer, G. (2009). The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 2672-2689.
- Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., and Lupold, S. (2011). Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem* 18 (27), 4206-4214.
- Ohuchi, S. (2012). Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access*. DOI: 10.1089/biores.2012.0253.
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z., Chen, H., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C., and Tan, W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *PNAS* 103, 32, 11838-11843.
- Shigdar, S., Lin, J., Yu, Y., Pastuovic, M., Wei, M., and Duan, W. (2011). RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Science* 5 (102), 991-998.
- Song, K-M., Lee, S., and Ban, C. (2012). Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors* 12, 621-631.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. (2007). SELEX – A (r)evolutionary method to generate method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24, 381-403.
- Thiel, K., Hernandez, L., Dassie, J., Thiel, W., Liu, X., Stockdale, K., Rothman, A., Hernandez, F., McNamara, J., and Giangrande, P. (2012). Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Research*, 1-19.
- Ting, G., Chan, C-H., Wang, H-E., and Lee, T-W. (2010). Nanotargeted Radionuclides for Cancer Nuclear Imaging and Internal Radiotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-17.
- Xiao, Z., Levy-Nissenbaum, E., Alexis, F., Luptak, A., Teply, B., Chan, J., Shi, J., Digga, E., Langer, R., and Farokhzad, O. (2012). Engineering of Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy Using Internalizing Aptamers Isolated by Cell-Uptake Selection. *American Chemical Society* 6 (1), 696-704.
- Ye, M., Hu, J., Peng, M., Liu, J., Liu, J., Liu, H., Zhao, X., and Tan, W. (2012). Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine. *Int J Mol Sci* 13, 3341-3353.
- Zhang, Y., Hong, H., and Cai, W. (2011). Tumor-Targeted Drug Delivery with Aptamers. *Curr Med Chem* 18 (27), 4185-4194.

### *Boeken*

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Reberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science).

Magill, J., Pfennig, G., Dreher, R., and Sóti, Z., (2012) *Karlsruhe Nuclide Chart*. 8<sup>th</sup> Edition.

Strachan, T., and Read, A. (2011). *Human Molecular Genetics* (Garland Science).

Universiteit Antwerpen, (2007). *Experimentele vaardigheden. Module 3: Biochemische vaardigheden* (Universiteit Antwerpen).

Zimmermann, R. (2007). *Nuclear Medicine. Radioactivity for Diagnosis and Therapy* (EDS Sciences).

### *Brochure*

SCK•CEN Studiecentrum voor Kernenergie, info@sckcen.be, 2010.

SCK•CEN Instituut voor Milieu, Gezondheid en Veiligheid, info@sckcen.be, 2010.

SCK•CEN Radiobiologie, sarah.baatout@sckcen.be, 2010.

### *Site*

<https://www.biacore.com/lifesciences/index.html>

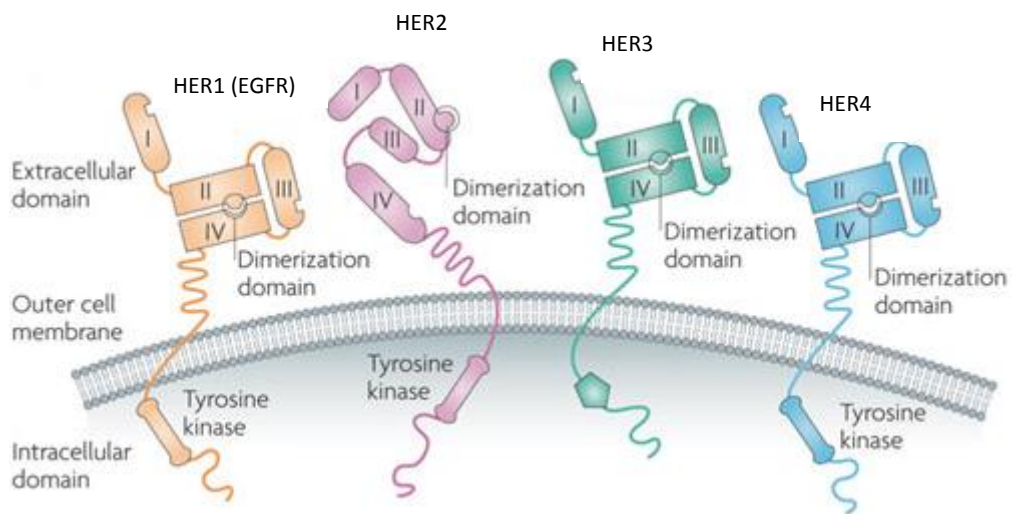
<http://www.roche-applied-science.com>

<http://www.sckcen.be/nl>

<http://www.sigmaaldrich.com>

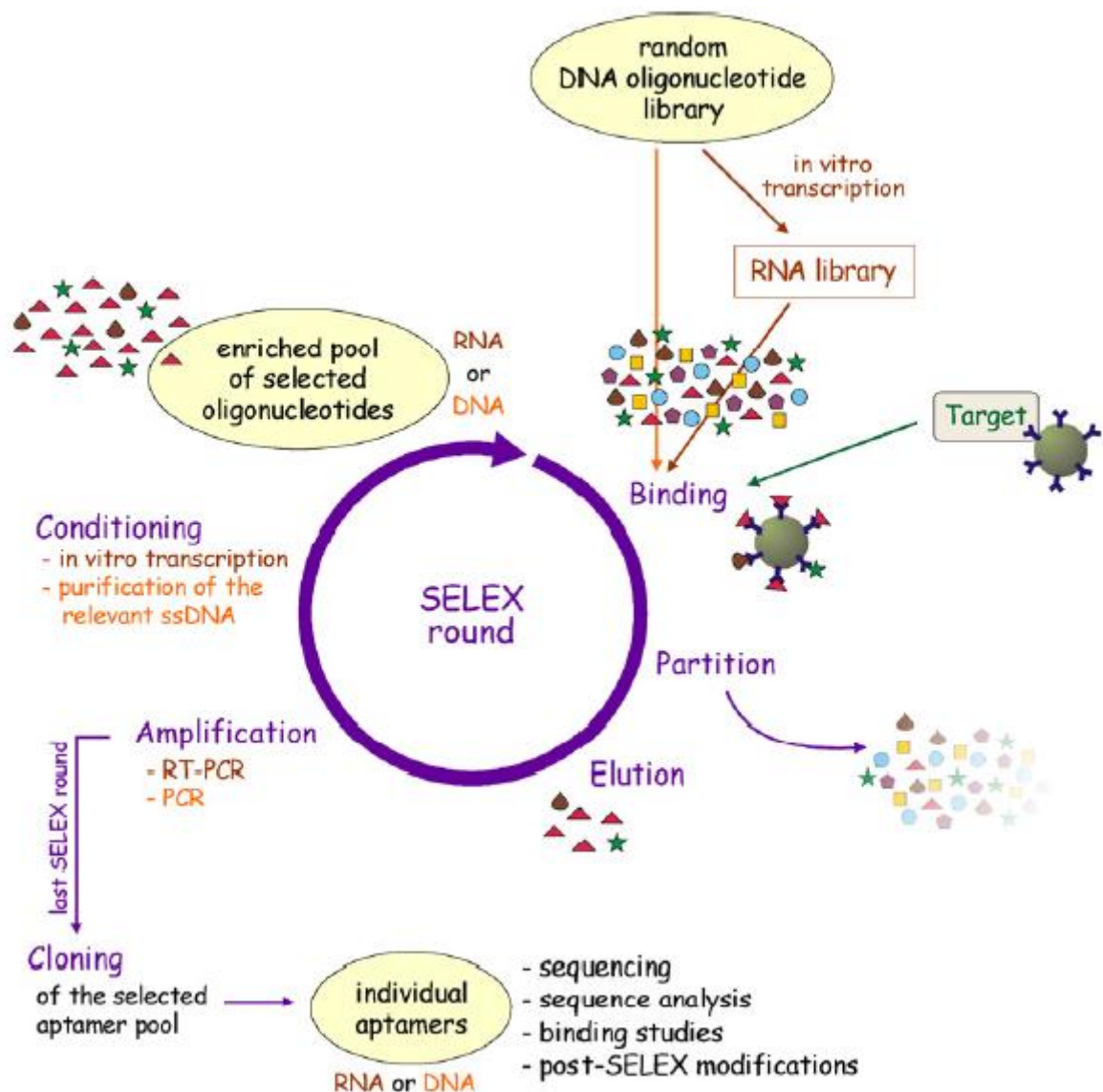


## Bijlagen



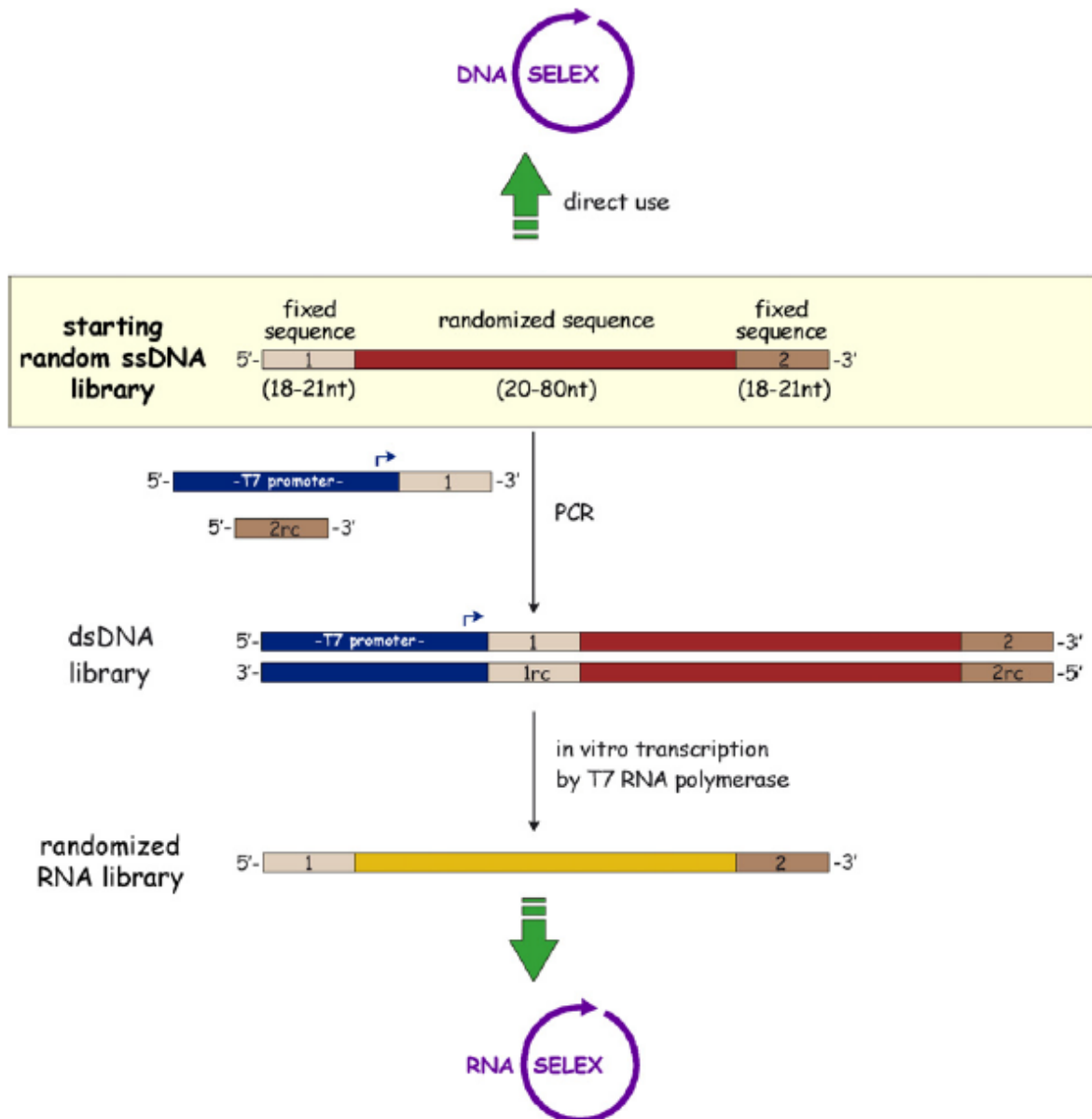
**Figuur 1.** De HER familie.

De tyrosine kinase receptoren hebben een gemeenschappelijke structuur: een extracellulair domein, waar ligand binding en dimerisatie plaatsvindt, een membraanoverbruggend domein en een intracellulair domein om intracellulaire processen van de cel te promoten. (Baselga et al, 2009).



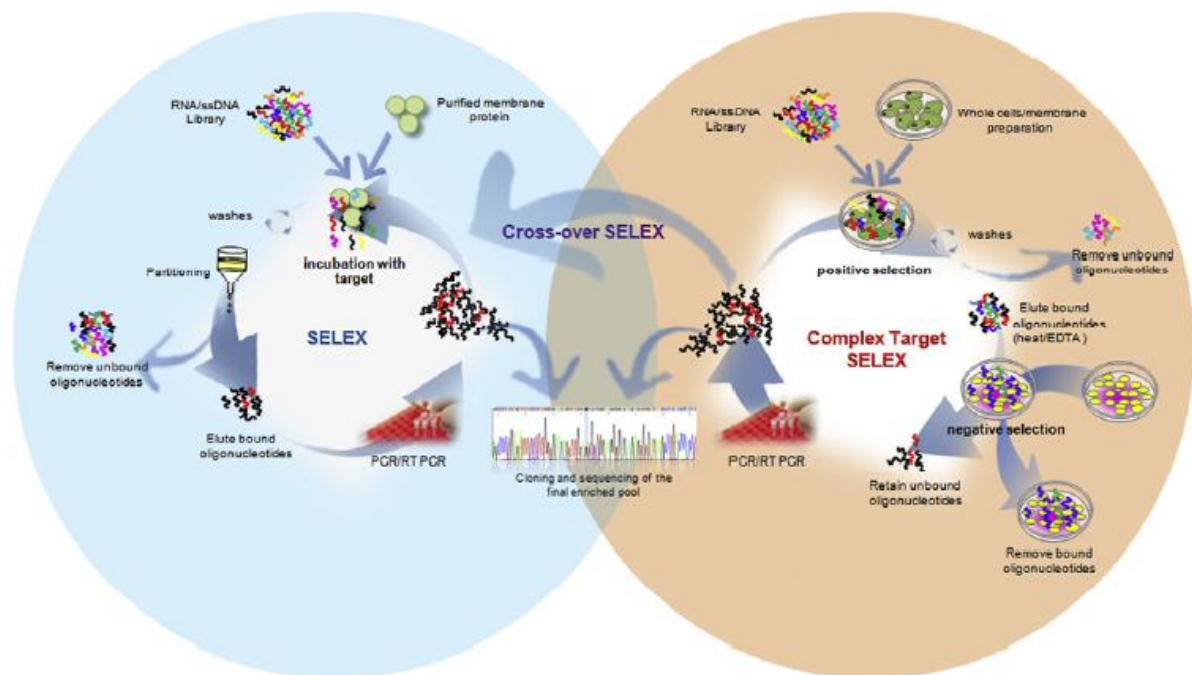
**Figuur 2.** Het SELEX proces.

Het proces start met de chemische synthese van een random ssDNA oligonucleotiden library, waarin ongeveer  $10^{15}$  verschillende sequenties aanwezig zijn. Deze library kan direct gebruikt worden voor de selectie van DNA aptameren (DNA SELEX). Om RNA aptameren te selecteren moet de library eerst omgezet worden in een RNA library (RNA SELEX). Het SELEX procedure is een iteratieve methode van selectie (binding, scheiding en elutie), amplificatie en conditionering. In de eerste SELEX ronde wordt de library geïncubeerd met de doelwitmoleculen, zodat oligonucleotiden met affiniteit voor het doelwit kunnen binden. Ongebonden oligonucleotiden worden verwijderd. De doelwit-bindende sequenties worden geëluëerd en vervolgens geamplificeerd door PCR om een verrijkte pool van geselecteerde oligonucleotiden te vormen. In de verrijkte pool moeten de geselecteerde oligonucleotiden vervolgens enkelstrengig gemaakt worden (DNA SELEX) vooraleer de tweede selectieronde gestart kan worden. Bij RNA SELEX moet eerst nog een *in vitro* transcriptie uitgevoerd worden. Algemeen wordt één cyclus 6 tot 20 keer herhaald om aptameren met hoge affiniteit te selecteren. De laatste SELEX ronde wordt beëindigd na de amplificatie stap. De verrijkte aptameren pool wordt gekloneerd en verscheidene individuele aptameren worden gekarakteriseerd. (Stoltenburg et al, 2007).



**Figuur 3.** DNA/RNA library.

Om aptameren te selecteren tegen een specifiek doelwit start het SELEX proces met de chemische synthese van random ssDNA oligonucleotiden, dewelke de library vormt. Elke oligonucleotide bevat een centrale regio van random sequenties (20-80 nt lang) en constante sequenties (aangeduid als 1 en 2) aan het 3'- en 5'-uiteinde. De constante sequenties vormen aanhechtingsplaatsen voor primers tijdens de PCR. Deze library kan direct gebruikt worden om DNA aptameren te selecteren (DNA SELEX). RNA aptameren kunnen pas geselecteerd worden nadat de DNA library eerst getransformeerd wordt in een dsDNA pool via PCR en vervolgens omgezet in RNA door *in vitro* transcriptie. In dit geval zijn twee speciale primers vereist voor het uitvoeren van de PCR. De antisense primer (aangeduid als 2rc) is reverse complementair aan de constante sequentie aan de 3'-kant van de library. De sense primer is afgeleid van de constante sequentie aan de 5'-kant. Daarenboven is deze gemodificeerd en bevat het de T7 promotor bindingsplaats. T7 RNA polymerase herkent specifiek deze promotor sequentie, waardoor een RNA library gesynthetiseerd wordt door *in vitro* transcriptie. (Stoltenburg et al, 2007).



**Figuur 4.** Cross-over SELEX proces.

De ssDNA/RNA library bevat ongeveer  $10^{15}$  sequenties, dewelke geïncubeerd worden met opgezuiverde eiwitten (SELEX) of levende cellen/membraan preparaties (Complex doelwit SELEX). De library wordt met de doelwitmoleculen geïncubeerd, en vervolgens worden de niet gebonden sequenties verwijderd. De gebonden sequenties worden geamplificeerd en overgeschreven (in het geval bij RNA library) om de pool van oligonucleotiden met affiniteit te verrijken. De SELEX cyclus wordt 5-20 keer herhaald. De uiteindelijk verrijkte pool bevat geselecteerde aptameren. Deze sequenties worden gekloneerd, gesequenced en geanalyseerd. Bij een cross-over SELEX wordt afwisselend geselecteerd tegen doelwitcellen en het gezuiverde eiwit. (Dua et al, 2011).