

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie  
der Freien Universität Berlin

**Selektion hochaffiner RNA-Moleküle**  
**gegen das**  
**Alzheimer  $\beta$ -Amyloid**

vorgelegt von

**Francisco Ylera Dahmen**

aus Krefeld

1998

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis August 1998 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. Dr. V. A. Erdmann  
Prof. Dr. B. Wittmann-Liebold

Tag der Disputatiuon: 29. April 1999

# Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Volker A. Erdmann für die wohlwollende Unterstützung bei dieser Arbeit. Für die Anregungen und Ratschläge sowie für die Betreuung danke ich Dr. Jens Peter Fürste. Prof. Dr. Brigitte Wittmann-Liebold danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Für das Korrekturlesen des Manuskripts danke ich Sandra Alsbach, Christian Frauendorf und Claudia Gauglitz. Bei ihr möchte ich mich auch besonders für das gute Klima und die Freundschaft in unserem kleinen Labor bedanken.

Dr. Werner Schröder danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalyse sowie die wissenschaftlichen Diskussionen. Mein Dank gilt auch Kerstin Dienus für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen, danke ich herzlich für die Zusammenarbeit.

Meiner WG, insbesondere Robert Meier, danke ich für die Unterstützung und Aufmunterung nach dem Laboralltag.

Ich möchte mich außerdem bei Dr. Gernot Langer von der Schering AG sowie bei Dr. Bernd Hinzmann bei Metagen für die Zurverfügungstellung des ABI-Sequencers bedanken. Bei der Arbeitsgruppe von Dr. W. Engel vom Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft möchte ich mich für die Durchführung der Untersuchungen am Elektronenmikroskop bedanken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Morbus Alzheimer.....	1
1.2	RNA.....	9
1.3	<i>In vitro</i> -Selektion.....	11
1.4	Stabilisierung von RNA.....	20
1.5	Vergleich von Aptameren und Antikörpern .....	21
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1	Chemische Nukleinsäuresynthese .....	25
3.1.1	Synthese des randomisierten DNA-Pools.....	25
3.1.2	Synthese der Primer .....	26
3.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	26
3.2.1	Gelelektrophorese .....	26
3.2.2	Nachweismethoden für Nukleinsäuren in Gelen .....	30
3.2.3	Gelfiltration.....	31
3.2.4	Ethanol-fällung.....	32
3.2.5	Phenol- und Chloroformextraktion.....	32
3.2.6	Messung der Radioaktivität .....	32
3.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	33
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	33
3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
3.3.2	T7-Transkription .....	35
3.3.3	Reverse Transkription.....	37
3.3.4	Sequenzierung.....	38
3.3.5	3'-Markierung von RNA.....	40
3.3.6	5'-Markierung von RNA.....	40
3.3.7	Nukleolytische Spaltung von RNA.....	41

3.3.8	Partielle alkalische Hydrolyse von RNA .....	42
3.4	Vorbereitung der Affinitätschromatographie .....	43
3.4.1	Immobilisierung der Peptide auf Sepharose .....	43
3.4.2	Bestimmung der Peptidkonzentration auf dem Säulenmaterial.....	44
3.4.3	Silikonisierung der Säulen .....	45
3.4.4	Optimierung des Bindungspuffers .....	45
3.4.5	Durchführung der <i>in vitro</i> -Selektion.....	45
3.4.6	Bestimmung der Dissoziationskonstanten .....	46
3.5	Mikrobiologische Methoden .....	47
3.5.1	Ligation .....	47
3.5.2	Transformation.....	48
3.5.3	Isolierung der Plasmide.....	48
3.6	Charakterisierung der Aptamere.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
4.1	Immobilisierung der Peptide .....	52
4.2	<i>In vitro</i> -Selektion.....	54
4.3	Charakterisierung der Aptamere.....	59
4.3.1	Sequenzanalyse .....	59
4.3.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>Anhang.....</b>		<b>89</b>
A	Geräte, Enzyme und Chemikalien .....	89
B	Puffer und Medien .....	92
C	Lebenslauf.....	94
D	Eigene Publikationen.....	95

# Abkürzungen und Einheiten

A	Ampere	RNA	Ribonukleinsäure
A, dA	Adenosin, Desoxyadenosin	RNase	Ribonuklease
ACh	Acetylcholin	rRNA	ribosomale RNA
APP	Amyloid Vorläuferprotein	RT	Raumtemperatur
APS	Ammoniumperoxodisulfat	s	Sekunde
ATP	Adenosintriphosphat	SAP	alkalische Phosphatase, Shrimps
βA4	β Amyloid	SDS	Natriumdodecylsulfat
Bq	Bequerel	SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
BMBF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie	ssDNA	Einzelstrang-DNA
bp	Basenpaare	T	Thymidin
BSA	Rinderserumalbumin	TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
C, dC	Cytidin, Desoxycytidin	TCA	Trichloressigsäure
Ci	Curie, 1 Ci = 37 MBq	TE	Tris-EDTA (Puffer)
CPG	controlled pore glass	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
cpm	counts per minute	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
DC	Dünnschichtchromatographie	tRNA	transfer RNA
dsDNA	Doppelstrang-DNA	U	unit, Einheit für die Enzymaktivität
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl	U	Uridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Upm	Umdrehungen pro Minute
DNase	Desoxyribonuklease	UV	Ultraviolettes Licht
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	V	Volt
DTT	Dithiothreit	v/v	Volumenprozent
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	W	Watt
g	Gramm	w/v	Gewicht pro Volumen
G, dG	Guanosin, Desoxyguanosin	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
h	Stunde		
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-imid-p-methoxytoluolsulfonat		
HFIP	Hexafluorisopropanol		
HIV	human immunodeficiency virus		
HPLC	high performance liquid chromatography		
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranosid	<b>Präfixe vor Einheiten:</b>	
Kd	Dissoziationskonstante	f	Femto (10 <sup>-15</sup> )
l	Liter	p	Pico (10 <sup>-15</sup> )
LB	Luria-Bertani	n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
m	Meter	μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
M	molar	m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
min	Minute	c	Centi (10 <sup>-2</sup> )
mRNA	messenger RNA	k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
NTP	Ribonukleosidtriphosphat	M	Mega (10 <sup>6</sup> )
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese		
PCR	Polymerasekettenreaktion		

Darüber hinaus wurden die allgemein üblichen Abkürzungen verwendet.