

3 Methoden

3.1 Chemische Nukleinsäuresynthese

3.1.1 Synthese des randomisierten DNA-Pools

Der RNA-Pool für die Selektion wurde durch Transkription eines synthetisierten DNA-Pools erhalten. Der DNA-Pool wurde chemisch an der Festphase mit Hilfe eines Applied Biosystems Syntheseautomaten (PCR-Mate EP 391 und 394) hergestellt. Die Synthese beruht auf dem Phosphoramidit-Verfahren (Beaucage & Caruthers, 1981) und wurde unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Phosphoramidite mit dC-gekoppelten Säulenmaterial (CPG) der Porengröße 100nm im 0,2 µmol-Maßstab durchgeführt. Die Phosphoramidite wurden in wasserfreiem Acetonitril gelöst (0,15 M). Die Kopplungszeit der Amidite wurde beim Standardsyntheseprotokoll von 15 s auf 35 s verlängert und die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe zu Anfang jedes Zyklus um 20 % verkürzt.

Der DNA-Template-Strang besteht aus einem 110mer, welches sich aus zwei flankierenden Primerregionen aus je 20 Basen mit bekannter Sequenz sowie einer randomisierten Region von 70 Basen in der Mitte zusammensetzt. Für die Synthese der randomisierten Region wurde ein Amiditgemisch verwendet, bei dem die unterschiedliche Reaktivität der Amidite bereits berücksichtigt wurde. Das Verhältnis der 4 Amidite dA : dG : dC : dT betrug 3 : 2,5 : 2,5 : 2.

Die Abspaltung der Schutzgruppen nach beendeter Synthese sowie die Abspaltung vom Säulenmaterial erfolgte in 1,5 ml konz. Ammoniak (33%) für 24 h bei 55 °C. Anschließend wurde der Ammoniak in einer Vakuumzentrifuge abgezogen und die DNA auf einem denaturierenden 8 %-Polyacrylamidgel aufgereinigt, durch UV-Shadowing identifiziert, aus dem Gel eluiert und durch Ethanol-fällung entsalzt (siehe 3.2).

Sequenz: 5'-d[CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG-(N)₇₀-GGT ACC GAG CTC GAA TTC CC]-3'

Bestimmung der Komplexität

Die Komplexität wurde ermittelt, indem man die Stoffmenge an DNA durch UV-Absorption bestimmt (siehe 3.2.6). Da die Wahrscheinlichkeit, daß zwei gleiche DNA-Sequenzen synthetisiert wurden, extrem gering ist ($4^{70} = 1,4 \cdot 10^{42}$ verschiedene mögliche Sequenzen),

wird davon ausgegangen, daß jede Sequenz unterschiedlich ist. Daraus folgt, daß die Stoffmenge an DNA gleich der Poolkomplexität ist.

Da nicht jede Sequenz von der Polymerase während der PCR vervielfältigt wird, weil eine für das Enzym ungünstige Sequenz vorliegt bzw. nicht alle Schutzgruppen abgetrennt wurden, wurde ein PCR-Zyklus mit radioaktiv markiertem dATP durchgeführt. Nach Abtrennung des überschüssigen dATPs durch Ethanol-fällung bzw. NAP-Säule kann durch Cerenkovzählung bestimmt werden, wieviel radioaktiv markierte DNA-Stränge synthetisiert wurden (siehe 3.2.7). Da die DNA-Ausgangskonzentration bekannt war, und nur maximal eine Kopie pro Molekül entstehen konnte, erhält man aus dem Verhältnis Ausgangskonzentration DNA zu radioaktiv markierter DNA den amplifizierbaren Anteil des hergestellten Pools. 60 % des Synthesepools konnten hierbei von der Polymerase kopiert werden.

3.1.2 Synthese der Primer

Die beiden Primer für die Vervielfältigung des DNA-Pools durch PCR wurden analog zur Synthese der DNA-Bibliothek durchgeführt. Die Synthese wurde im 1 µmol-Maßstab nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Aufreinigung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurde Säulenmaterial mit einer Porengröße von 50 nm verwendet.

Primer A: 5'-d[TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ATT CGA GCT CGG TAC C]-3'

Primer B: 5'-d[CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG]-3'

3.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.1 Gelelektrophorese

Die gängigste Methode zur Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Gelelektrophorese. Sie beruht auf der Wanderung der geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld. Man arbeitet hier bei einem pH-Wert von ca. 8,5, an dem die Nukleinsäuren als Polyanion vorliegen und zur positiv geladenen Anode wandern. Dabei macht man sich die von der Länge abhängige Mobilität der Nukleinsäure in einer Gelmatrix zunutze. Als Gelmatrix werden am häufigsten Agarose und Polyacrylamid verwendet. Während man mit Agarosegelen die Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen auftrennt, kann mit Polyacrylamidgelen sowohl unter nativen als auch durch Zusatz von Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden.

Agarosegele werden in der Regel bei Molekülgrößen von 100-20000 Basenpaaren verwendet, Polyacrylamidgele bei Molekülgrößen bis 500 Basen.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird die Gelmatrix durch radikalische Polymerisation von Acrylamid mit *N,N'*-Methylenbis(acrylamid) als Quervernetzer hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumperoxodisulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Radikalstabilisator. Die Porengröße des Gels kann durch die Konzentration der Monomere sowie der Konzentration des Vernetzers eingestellt werden.

Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Trennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren arbeitet man unter denaturierenden Bedingungen, um die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, die zu unterschiedlichem Laufverhalten im Gel führen können, zu unterbinden. Dazu gibt man 7 M Harnstoff zu dem Polymerisationsansatz.

Die Trennung erfolgt auf einem 21,5 x 19 cm Gel mit einer Dicke von 1 mm bei 70 mA in 1 x TBE-Puffer.

Acrylamidkonz.	6 %	8 %	10 %	12 %
Acrylamid/Bisacrylamid (40 % / 2 %)	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
5 x TBE	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Harnstoff	21 g	21 g	21 g	21 g

Der Ansatz wird auf 50 ml mit Wasser aufgefüllt und die Polymerisation durch Zusatz von 300 µl APS (10 %) und 30 µl TEMED gestartet. Nach 45 min Polymerisation wird das Gel für mind. 15 min bei 600V vorlaufen gelassen, damit sich eine konstante Temperatur einstellen kann.

Die Proben werden mit dem gleichen Volumen Formamid versetzt. Der Verlauf der Elektrophorese kann durch die Benutzung einer Lösung der beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol in Formamid beobachtet werden.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung doppelsträngiger DNA wird unter nativen Bedingungen durchgeführt. Dabei geht man wie oben beschrieben vor, jedoch entfällt der Zusatz von Harnstoff. Die Proben werden mit dem gleichen Volumen an nativem Probenpuffer versetzt. Im Gegensatz zur denaturierenden PAGE darf das Gel bei der nativen PAGE nicht zu warm werden (Denaturierung der DNA). Deshalb wird bei einer Spannung von 300-400 V aufgetrennt.

Sequenzgele

Für die Auftrennung der Produkte der radioaktiven Sequenzierung wurden 6 %ige denaturierende Gele verwendet. Diese Gele mit den Maßen 42 x 33 cm sind lediglich 0,4 mm dick. Damit nach beendeter Elektrophorese das Gel auf einer Glasplatte haftet, und man die andere Platte abnehmen kann, ist eine spezielle Behandlung der beiden Glasplatten notwendig.

Dazu wird auf der großen, haftenden Glasplatte eine Lösung aus 200 µl Silan A-174 (Methacryloxypropyltrimethoxysilan, Pharmacia) und 1 ml Eisessig in 20 ml Ethanol mit einem fusselfreiem Papiertuch gleichmäßig verteilt. Diese Prozedur wiederholt man 20 min später. Nach 60 min wird die Platte gründlich mit Ethanol abgerieben und für mindestens 60 min getrocknet. Die kleine, nicht haftende Glasplatte wird mit einer 2 %-igen Lösung aus Dichlordimetylsilan in 1,1,1-Trichlorethan (Repel-Silan, Pharmacia) solange eingerieben, bis die Lösung in Form kleinster Tröpfchen auf der Glasplatte abperlt. Diese Prozedur wurde nach 30 min wiederholt, und nach weiteren 60 min wurde die Platte gründlich mit Wasser abgerieben und für mindestens 60 min trocknen gelassen.

Gellösung:

42 g Harnstoff
12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (40 % / 2 %)
20 ml 5 x TBE
ad 100 ml mit H₂O auffüllen

Vor Zugabe von APS und TEMED wird der Polymerisationsansatz noch einmal über einen Faltenfilter filtriert. Man läßt das Gel mindestens 45 min polymerisieren und anschließend für 30 min bei 55W vorlaufen. Unter Verwendung eines sogenannten „Haifischkamms“ können 48 ³⁵S-markierte Proben (=12 Sequenzierungen) auf das Gel aufgetragen werden.

Nach beendeter Elektrophorese wird die kleine Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Gel auf der großen Glasplatte wird zum Eluieren des Harnstoffs für 6 min mit dest. Wasser gespült

und anschließend im Trockenschrank bei 60 °C für 30 min getrocknet. Anschließend kann für die Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Man exponiert den Film für mindestens 12 h auf dem Gel.

Bei der Verwendung eines ABI-Sequencer entfällt die Vorbehandlung der Glasplatten. Hier werden die Glasplatten vor der Benutzung in den Sequencer eingesetzt und überprüft, daß keine Grundabsorption aufgrund von Verunreinigungen vorhanden ist. Man läßt 1 h bei 55W vorlaufen. Da die Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, entfällt die Nachbehandlung des Gels. Nach abgeschlossener Elektrophorese werden am Computer die Banden den Proben zugeordnet und die Analysesoftware gestartet.

Gele für die Spaltungsanalyse

Für die Sekundärstrukturanalyse der Aptamere durch enzymatische RNA-Spaltung wurden 25 %-ige denaturierende Polyacrylamidgele verwendet (42 x 33 cm, 0,4 mm Dicke). Hier wurden die beiden Monomere Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 50:2 eingesetzt. Eine Vorbehandlung der Glasplatten ist aufgrund der höheren Stabilität des Gels nicht notwendig. Man läßt für 60 min bei 1500 V vorlaufen und trennt die Proben anschließend bei 55 W auf. Nach beendeter Elektrophorese wird eine Glasplatte abgehoben und das Gel auf einen alten Röntgenfilm transferiert und in Frischhaltefolie eingewickelt. Anschließend kann für die Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt werden.

Gellösung:

42 g Harnstoff
50 ml Acrylamid/Bisacrylamid (50 % / 2 %)
20 ml 5 x TBE

Agarosegelelektrophorese

Agarosegele werden zur Auftrennung großer DNA-Moleküle unter nativen Bedingungen verwendet. In dieser Arbeit wurden sie zur Analyse der Produkte nach der PCR sowie der Analyse der Plasmid-DNA aus Minipräparationen verwendet. Die Porengröße kann durch Verändern der Agarosekonzentration variiert werden und ist abhängig von der verwendeten Agarose (Kettenlänge).

2% (w/v) Agarose wird in einem Erlenmeyerkolben in 1 x TBE-Puffer in der Hitze gelöst (Mikrowelle). Man läßt den Ansatz auf ca. 50 °C abkühlen und gibt dann für die Detektion der DNA 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 100 ml Ansatz zu und gießt das Gel. Nach

dem Erkalten des Gels können die Proben, die mit dem gleichen Volumen nativen Probenpuffer versetzt wurden, aufgetragen und bei 100-110 V elektrophoretisiert werden. Es wurden Flachgelkammern von BioRad (Mini und Wide Mini Sub DNA Cells) verwendet.

Gelelution von Nukleinsäuren

Die durch UV-Shadowing bzw. Autoradiographie detektierte ausgeschnittene Gelbande wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Wasser und 40 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,5) versetzt. Man schüttelt bei 4 °C für mindestens 12 h oder bei 70 °C für 1 h und gibt das Eluat in ein neues Eppendorfgefäß. Durch Ethanolfällung oder Gelfiltration kann die Lösung von Harnstoff und Salzen befreit werden.

3.2.2 Nachweismethoden für Nukleinsäuren in Gelen

Ethidiumbromidfärbung

Die Verwendung von Ethidiumbromid ist die schnellste und gebräuchlichste Methode für den analytischen Nachweis von Nukleinsäuren. Ethidiumbromid ist ein heterozyklischer, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der in die Nukleinsäuren interkaliert wird. Die Arbeiten mit dem Farbstoff sollten sorgfältig durchgeführt werden, da Ethidiumbromid stark mutagen ist.

Polyacrylamidgele werden für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) in 1 x TBE angefärbt. Bei Agarosegelen wurde das Ethidiumbromid bereits zu der Gellösung zugesetzt. Auf einem Transilluminator kann man bei 306 nm Durchlicht die Nukleinsäuren als leuchtende Banden erkennen.

UV-Shadowing

Bei der präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren möchte man Wechselwirkungen mit Farbstoffen umgehen. Für den Nachweis macht man sich die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm zunutze. Dazu wird das Gel auf eine in Frischhaltefolie eingewickelte Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (60 F₂₅₄) behandelt wurde. Durch aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) kann man die Nukleinsäuren als dunklen Schatten erkennen und ausschneiden. Um eine Schädigung der Nukleinsäuren durch das UV-Licht zu vermeiden, sollte dieser Schritt möglichst schnell durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Empfindlichkeit (0,5-1 A₂₆₀), weshalb sie vor allem bei präparativen Aufreinigungen benutzt wird.

Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren (^{32}P oder ^{35}S) können in Gelen, je nach ihrer spezifischen Aktivität, in geringsten Mengen durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms nachgewiesen werden (< fmol).

Gele mit ^{32}P -markierten Oligonukleotiden werden nach Abnehmen einer Glasplatte in Frischhaltefolie eingewickelt. Möchte man die Nukleinsäure aus dem Gel ausschneiden und eluieren, wird das Gel mit drei phosphoreszierenden Punkten markiert. In einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie (Kodak) legt man einen Röntgenfilm (Fuji) auf das Gel. Je nach Menge und spezifischer Aktivität der Nukleinsäure exponiert man den Film für 5 min bis 24 h. Bei längeren Expositionszeiten friert man die Kassette bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein, um eine Diffusion der Oligonukleotide zu verhindern.

Sequenzgele mit ^{35}S -markierten Nukleinsäuren werden nach der Elektrophorese auf der großen Glasplatte getrocknet. Anschließend wird ein Röntgenfilm auf dem trockenen Gel bei Raumtemperatur für 1 bis 2 Tage exponiert.

Die exponierten Filme werden entwickelt (1-2 min, Röntgenentwickler G150, Agfa-Gefaert N. V.), fixiert (3 min, Röntgenfixierer G350, Agfa-Gefaert N. V.), gewässert (5 min) und getrocknet.

Möchte man die Nukleinsäuren eluieren, so schneidet man die schwarzen Banden auf dem Röntgenfilm aus, legt den Film so auf das Gel, daß die 3 Marker mit den schwarzen Punkten auf dem Film übereinstimmen, schneidet die Banden aus und eluiert wie oben beschrieben.

3.2.3 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration können Nukleinsäurelösungen von Salzen und anderen niedermolekularen Verbindungen abgetrennt werden. Man macht sich dabei das unterschiedliche Permeationsverhalten der Moleküle in die Poren des Gelbetts zunutze (Gelpermeationschromatographie). Die großen Moleküle können im Gegensatz zu den kleinen nicht in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden deshalb sofort eluiert. Verwendet wurden vorgefertigte Säulen der Firma Pharmacia mit Sephadex G-25 (NAP-5, NAP-10, NAP-25) oder G-50 (NICK). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.4 Ethanolfällung

Nukleinsäuren können aus wäßriger Lösung durch Ethanol in Anwesenheit von Natriumacetat bei pH 5,5 präzipitiert werden, während Salze und andere Verunreinigungen in Lösung bleiben. Dazu wird die Nukleinsäurelösung mit 1/10 des Volumens einer 3M Natriumacetatlösung (pH 5,5) und dem 2,5 fachen Volumen an Ethanol versetzt und für 10 min auf -20 °C gestellt. Anschließend zentrifugiert man 30 min bei 10000-14000Upm / 4 °C, verwirft die überstehende Ethanollösung, wäscht das Pellet mit 400 µl 70 % Ethanol und zentrifugiert weitere 5 min. Man nimmt den Überstand ab und trocknet das Pellet bei Raumtemperatur. Bei sehr kleinen Nukleinsäuremengen kann die Präzipitation durch die Zugabe von Glycogen verbessert werden. Die nach den Selektionsrunden eluierte RNA wurde grundsätzlich für 1 h bei -20 °C in Anwesenheit von 40 µg Glycogen gefällt.

3.2.5 Phenol- und Chloroformextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wäßrigen Lösungen z. B. nach Enzymreaktionen, zur Trennung des Peptid-RNA-Komplexes nach der Selektion oder bei der Isolierung von Plasmiden aus Zellen, versetzt man die Lösung mit dem gleichen Volumen Tris-gesättigten Phenols (pH 8,0) und vortext kräftig. Man trennt die beiden Phasen durch Zentrifugation bei 13000 Upm und nimmt die wäßrige obere Phase vorsichtig ab. Die phenolische Phase kann noch einmal mit dem halben Volumen Wasser versetzt werden, geschüttelt und zentrifugiert werden. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert, um restliches Phenol aus der wäßrigen Lösung zu entfernen. Schon geringe Spuren Phenol können nachfolgende Enzymreaktionen beträchtlich einschränken oder sogar komplett inhibieren.

3.2.6 Messung der Radioaktivität

Die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren ist eine praktische Methode, um selbst kleinste Mengen noch detektieren zu können. Die Quantifizierung erfolgt bei ³²P-Markierung durch Cerenkov-Zählung. Dazu wird das Eppendorfgefäß mit der Probe in einem Szintillationsröhrchen im Szintillationszähler (LS 6000 SC, Beckman) mit Programm 1 (³²P, Cerenkov-Zählung) eine Minute vermessen. Man erhält die Ergebnisse in cpm (*counts per minute*).

3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Aufgrund des Absorptionsmaximums der Basen der Nukleinsäuren im UV-Bereich bei 260 nm kann mit einem Photometer die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen bestimmt werden. Näherungsweise gelten folgende Gleichungen:

$$\text{ssDNA:} \quad \text{Anzahl der } \mu\text{mole} = \frac{\text{Gesamt OD}_{260}}{10 \cdot \text{Anzahl der Basen}}$$

$$\text{dsDNA:} \quad 1 \text{ OD} = 50 \mu\text{g}$$

$$\text{pmol} = \frac{\mu\text{g} \cdot 1\,000\,000}{2 \cdot \text{Anzahl der Basen} \cdot 325}$$

$$\text{RNA:} \quad 1 \text{ OD} = 40 \mu\text{g}$$

$$\text{pmol} = \frac{\mu\text{g} \cdot 1\,000\,000}{\text{Anzahl der Basen} \cdot 337}$$

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA. Es werden neben der zu amplifizierenden DNA zwei 15-30 Basen lange Oligonukleotide (Primer) mit definierter Sequenz benötigt, die zu den 3'-Enden des DNA-Templates bzw. dessen Gegenstrang komplementär sind. Nach einem Denaturierungsschritt hybridisieren diese Primer in einem Primer-Annealing-Schritt mit dem zu amplifizierenden DNA-Template. Dabei wird die Annealing-Temperatur so hoch gewählt, daß keine unspezifische Hybridisierung auftritt. Mit einer thermostabilen DNA-Polymerase erfolgt im Extensionsschritt die Verlängerung des Primers entlang des Templates in 5'-3'-Richtung. Im Idealfall erhält man so aus jedem DNA-Doppelstrang zwei neue DNA-Stränge. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser drei Schritte (bis zu 30 Zyklen) erhält man eine exponentielle Zunahme der DNA.

Als DNA-Template kann sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA eingesetzt werden. Durch Verwendung von überhängenden Primern kann eine Verlängerung der DNA erreicht

werden. Dies wurde für die Einführung des T7-Promotors in die chemisch synthetisierte DNA ausgenutzt. Alle Reaktionen wurden mit der *Pfu* Polymerase durchgeführt, die sich von der *Taq* Polymerase durch ihre *Proof-Reading*-Aktivität und ihre Exonukleaseaktivität unterscheidet, die für eine niedrigere Fehlerrate sorgt. Im Anschluß an die PCR wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-fällung durchgeführt, um die *Pfu* Polymerase (mit der Exonukleaseaktivität) zu entfernen..

Standardansatz:

10 µl 10 x *Pfu*-Puffer
 4,8 µl MgCl₂ (100mM)
 0,5 µl BSA (2µg/µl)
 4 µl Primer A (100 µM)
 4 µl Primer B (100 µM)
 4 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)
 1 ng DNA-Template
 1 µl *Pfu* Polymerase (2,5 U/µl)
 ad 100 µl mit H₂O auffüllen

Temperaturbedingungen:

94 °C / 4 min Initiationsdenaturierung
 94 °C / 2 min Denaturierung
 55 °C / 2 min Annealing
 75 °C / 6 min Extension
 12-20 Zyklen

Präparative PCR

Für die Amplifikation der synthetisierten DNA-Bibliothek wurde die Reaktion nicht in PCR-Reaktionsgefäßen, sondern in 10 ml Glasgefäßen durchgeführt (6 x 5 ml), die in drei Wasserbädern entsprechender Temperatur geschwenkt wurden. Aufgrund des großen Volumens wurden die Reaktionszeiten verlängert und die Temperaturen um 2 °C erhöht und die Zyklenzahl auf 10 beschränkt. Ferner wurde die Dauer der letzten Extensionphase verdoppelt.

präparativer Ansatz:

3000 µl 10 x *Pfu*-Puffer
 1440 µl MgCl₂ (100 mM)
 15 µl BSA (20 µg/µl)
 1200 µl Primer A (120 nmol)
 1200 µl Primer B (120 nmol)
 480 µl dNTP-Mix (100 mM je dNTP)
 300 µl *Pfu* Polymerase
 ad 30 ml mit H₂O auffüllen

Temperaturbedingungen:

96 °C / 4 min Initiationsdenaturierung
 96 °C / 5 min Denaturierung
 56 °C / 5 min Annealing
 77 °C / 12 min Extension
 10 Zyklen
 75 °C / 12 min Zusatzextension

Im Anschluß an die PCR wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine Probe (30 µl) über ein 8 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und entsalzt. Durch Vergleich der Absorption bei 260 nm vor und nach der Aufreinigung kann die Konzentration des Pools berechnet werden.

PCR nach reverser Transkription

Der Ansatz der reversen Transkription wurde auf vier 100 µl Ansätze verteilt. Die Zeiten der drei Schritte wurden etwas verlängert, um auch die Vervielfältigung schlecht amplifizierbarer DNA-Sequenzen zu gewährleisten. Die Anzahl der Zyklen wurde an die Menge an eluierte RNA nach der Selektion angepaßt. Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion und der Ethanolfällung wurde die DNA in 200 µl Wasser gelöst.

Reaktionsansatz:	Temperaturbedingungen:
20 µl Ansatz aus rev. Transkription	94 °C / 4 min Initiationsdenaturierung
40 µl 10 x <i>Pfu</i> -Puffer	
19,2 µl MgCl ₂ (100 mM)	94 °C / 2 min Denaturierung
16 µl Primer A (100 µM)	55 °C / 2 min Annealing
16 µl Primer B (100 µM)	75 °C / 10 min Extension
2 µl BSA (2µg/µl)	6-16 Zyklen
16 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	
4 µl <i>Pfu</i> Polymerase	
ad 400 µl mit H ₂ O auffüllen	

PCR zur Amplifikation klonierter Sequenzen

Nach der Klonierung und Isolierung der Plasmide wurde die Insert-Sequenz durch PCR aus dem vollständigen Vektor heraus amplifiziert. Die Aufreinigung erfolgt wie oben beschrieben.

Standardansatz:	Temperaturbedingungen:
40 µl 10 x <i>Pfu</i> -Puffer	94 °C / 4 min Initiationsdenaturierung
19,2 µl MgCl ₂ (100mM)	
2 µl BSA (2µg/µl)	94 °C / 2 min Denaturierung
16 µl Primer A (50 µM)	54 °C / 2 min Annealing
16 µl Primer B (50 µM)	75 °C / 6 min Extension
16 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	25 Zyklen
2 µl Vektor (1/10 Volumen der Minipräp)	
4 µl <i>Pfu</i> Polymerase (2,5 U/µl)	
ad 400 µl mit H ₂ O auffüllen	

3.3.2 T7-Transkription

Mit Hilfe der *in vitro*-Transkription kann eine zu einer DNA-Sequenz komplementäre RNA hergestellt werden. Dazu muß die DNA-Matrize einen 3'-terminalen Erkennungsbereich aus 17 Basen, den T7-Promotor, enthalten. Unmittelbar hinter diesem Promotor wird die

Transkription durch die T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 gestartet. Man kann die Effizienz der Polymerase erhöhen, indem man das Transkript mit zwei Guanosinnukleotiden beginnen läßt.

Standardansatz:

- 10 µl 10 x Transkriptionspuffer
- 10 µl DTT (100 mM)
- 6 µl BSA (2 µg/µl)
- 16 µl NTP-Mix (100 mM je NTP)
- 50 µl DNA-Matrize (ca. ¼ eines PCR-Ansatzes)
- 2 µl T7-Polymerase (50 U/µl)
- ad 100 µl mit H₂O auffüllen

Durch Zugabe von α -³²P-CTP kann die RNA radioaktiv markiert werden. Nach 2-3 h Inkubation bei 37 °C wird die RNA auf einem 6 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und durch Ethanol-fällung entsalzt. Nach der Ethanol-fällung wurde nur noch mit silikonisierten Eppendorfgefäßen gearbeitet, um einen Verlust der RNA durch Adsorption an der Gefäßwand zu minimieren.

Präparative Transkription

Zur Herstellung des RNA-Startpools für die Selektion wurde eine präparative Transkription mit 3,8 ml Volumen angesetzt (19 x 200 µl). Außerdem wurde die DNA-Konzentration erhöht auf 40 pmol/100 µl Ansatz. Es wurden 1,6 nmol DNA eingesetzt, entsprechend einer Pool-Komplexizität von 1×10^{15} . Die Reaktionszeit wurde auf 5 h erhöht.

Präparative Transkriptionsansatz:

- 320 µl DNA-Pool (1,6 nmol)
- 380 µl 10 x Transkriptionspuffer
- 380 µl DTT (100 mM)
- 22,5 µl BSA (20 µg/µl)
- 600 µl NTP-Mix (100 mM je NTP)
- 10 µl α -³²P-CTP
- 75 µl T7-Polymerase
- ad 3,8 ml mit H₂O auffüllen

Soll radioaktiv markierte RNA durch Zugabe von α -³²P-CTP hergestellt werden, so nimmt man von dem Reaktionsansatz ein kleines Aliquot (1/50 des Ansatz) als Vergleichswert ab, um die spezifische Radioaktivität der RNA bestimmen zu können. Die Radioaktivität in dieser Probe entspricht 1/50 der zugesetzten Menge an CTP. Die Stoffmenge des zugesetzten radioaktiven CTPs ist aufgrund der hohen Aktivität vernachlässigbar gering. Aus der Aktivität

der Vergleichsprobe $cpm_{\text{Vergleich}}$ und der eigentlichen Probe cpm_{Probe} kann man die Stoffmenge des eingebauten Cytidins n_C in der Probe berechnen. Durch Division durch die Anzahl der Cytidinnukleotide in der RNA erhält man die Stoffmenge der RNA n_{RNA} . Zur Berechnung der Anzahl der Cs geht man im randomisierten Bereich davon aus, daß jede vierte Base ein Cytidin ist. Zuzüglich der Cytidinbasen in den beiden Primerregionen sind statistisch 31,5 Cs in der RNA enthalten.

$$n_C = \frac{c_{\text{CTP}} \cdot V_{\text{CTP}}}{50 \cdot cpm_{\text{Vergleich}}} \cdot cpm_{\text{Probe}}$$

$$n_{\text{RNA}} = \frac{n_C}{31,5}$$

c_{CTP} : Konz. der CTP-Stammlösung

V_{CTP} : Eingesetztes Volumen an CTP

$cpm_{\text{Vergleich}}$: Aktivität der Vergleichsprobe

cpm_{Probe} : Aktivität der Probe

n_C : Stoffmenge an C in der Probe

n_{RNA} : Stoffmenge der RNA in der Probe

3.3.3 Reverse Transkription

Für eine spätere Amplifikation durch PCR wurde die RNA nach jeder Selektionsrunde mit der Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde eine Transkriptase mit einer RNase H-Deletion, d. h. die RNA wird bei der Transkription nicht verdaut, und es ist möglich, mehrere DNA-Kopien von einem RNA-Strang herzustellen. Ähnlich wie bei der PCR wird auch hier ein zum 3'-Ende komplementäres Oligonukleotid benötigt, um ein DNA-RNA-Hybrid zu bilden, welches anschließend von der Reversen Transkriptase verlängert wird.

Hybridisierung:

10 µl RNA (selektiert)

2 µl Primer B (100 µM)

Inkubation bei 70 °C / 10 min

Inkubation bei 46 °C / 2 min

Reverse Transkription:

12 µl Annealingansatz

4 µl 5 x RT-Puffer

2 µl DTT (100 mM)

1 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)

1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Man inkubiert eine Stunde bei 46-48 °C und fährt dann sofort mit der PCR fort (3.3.1).

3.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt durch Anlagerung eines Sequenzierungsprimers an die einzelsträngige DNA, der dann von einer DNA-Polymerase entlang des Plasmids verlängert wird. Durch Zugabe von Didesoxyribonukleotiden, an die keine weiteren dNTPs gekoppelt werden können, kommt es statistisch zu einem Abbruch der Kettenverlängerung hinter jeder einzelnen Base.

Radioaktive Sequenzierung mit ^{35}S

Bei der radioaktiven Sequenzierung mit ^{35}S wird zusätzlich zu den dNTPs auch noch ^{35}S -dATP (oder ^{35}S -dCTP) eingebaut, um eine Detektion durch Autoradiographie zu ermöglichen. Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierungs-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt. Durch Verwendung des Universal- und des Reverse-Primers wird sowohl der Strang als auch der Gegenstrang sequenziert, wodurch man eine fehlerhafte Sequenzierung z. B. durch Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur besser erkennen kann. Damit die DNA einzelsträngig vorliegt, wird sie im ersten Schritt denaturiert. Nach der Hybridisierung des Primers wird die Probe für die Sequenzierungsreaktion auf vier Eppendorfgefäße entsprechend der vier Basen verteilt und das jeweilige Didesoxynukleotid zugegeben. Man läßt genau 5 min bei 37 °C reagieren und bricht die Polymerisation durch Zugabe der Stop-Lösung auf Eis ab. Die Hälfte jeder Probe wird zur Auftrennung auf ein 6 %-Sequenzierungsgel aufgetragen (siehe 3.2.1). Von dem Gel wird ein Autoradiogramm erstellt, auf dem die jeweilige Sequenz abgelesen werden kann.

1.) Denaturierung:

10 µl Plasmid-DNA
2,5 µl NaOH (2 M, frisch angesetzt)
Inkubation für 10 min / RT

3,75 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,5)

8,75 µl H₂O

75 µl Ethanol

Ethanol-fällung, Aufnehmen in 10 µl H₂O

3.) Markierung:

14 µl Annealing-Ansatz
3 µl Labelling-Mix (A-Mix)
1 µl [α - ^{35}S]-dATP (10 µCi/µl)
2 µl T7-DNA Polymerase (1,5 U/µl)
4 min / RT

2.) Hybridisierung:

10 µl Plasmid, denaturiert

2 µl Annealing-Puffer

2 µl Primer (5 pmol/µl)

Inkubation 20 min / 37 °C und 10 min / RT

4.) Abbruchreaktion:

2,5 µl jeweils A, C, G oder T-Mix

4,8 µl Labelling-Ansatz

37 °C / 5 min

6 µl Stop-Lösung

Sequenzierung mit dem ABI-Sequencer

Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt beim ABI-Sequencer durch Fluoreszenzmessung. Dazu arbeitet man mit Didesoxynukleotiden, die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert wurden und daher bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren. Dadurch muß die Reaktion und die Auftrennung auf dem Gel für die einzelnen Basen nicht getrennt durchgeführt werden, wodurch sich die Zahl der Proben um 75 % verringert. Die Sequenzierung wurde mit dem Kit von Perkin-Elmer nach der Methode des Cycle-Sequencing im Thermocycler durchgeführt. Wie bei einer normalen PCR bildet die Polymerase den Gegenstrang zur Template-DNA, nur daß beim Cycle-Sequencing lediglich ein Primer vorhanden ist, also nur ein Strang vervielfältigt wird, und daß durch Einbau der ddNTPs die Kettenverlängerung statistisch an jeder Stelle des Templates abgebrochen wird. Dadurch verringert sich die benötigte Menge an DNA auf 1/10 einer Plasmidisolierung.

Sequenzierungsansatz:

5 µl Plasmid
5 µl Primer (5 pmol/µl) universal/reverse
10 µl Sequenzierungsmix

Temperaturbedingungen:

96 °C / 2 min Initiationsdenat.
96 °C / 15 sec Denaturierung
50 °C / 15 sec Annealing
60 °C / 4 min Extension
25 Zyklen

Da der Überschuß der fluoreszenzmarkierten ddNTPs bei der fluorometrischen Analyse stört, werden diese durch Gelfiltration mit Spin Columns vorher abgetrennt. Dabei wurden Centri-Sep (Princeton Separation) bzw. Centriflex (Advanced Genetic Technologies Corp.) Spin Columns entsprechend der Anleitung verwendet. Die Centriflex-Säulen haben den Vorteil, daß sie bereits vorgequollen sind und daher direkt einsatzbereit sind. Eine Abtrennung der ddNTP durch eine Ethanol-fällung ist ebenfalls möglich. Das ist gerade bei einer großen Anzahl von Proben schneller und kostengünstiger, jedoch gelingt die Abtrennung der ddNTPs nicht quantitativ, weshalb die Auftrennung der ersten 20 Basen auf dem Sequenzgel nicht sauber gelingt. Da aber die Sequenzierungsprimersequenz in einem größeren Abstand von dem Insert liegt, ist dies kein großer Nachteil. Die gereinigten Proben werden in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt und in 2 µl Probenpuffer gelöst. 1-1,5 µl dieser Probe werden anschließend auf das 6 % denaturierende Sequenzierungsgel aufgetragen. Nach beendeter Elektrophorese erfolgt die Zuordnung der Proben sowie die Überprüfung der Auswertung des Computers.

3.3.5 3'-Markierung von RNA

Die radioaktive 3'-Markierung erfolgt durch Veresterung der freien 3'-Hydroxylgruppe der RNA mit der 5'-Monophosphatgruppe eines Cytidin-3'-[5'-³²P]-diphosphats (pCp). Diese Ligation wird durch die T4-RNA-Ligase unter ATP-Hydrolyse katalysiert.

Nach einer 18-stündigen Inkubation bei 4 °C wird der Reaktionsansatz über ein 12 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und mit Ethanol gefällt.

Reaktionsansatz:

- 12 µl RNA (2 pmol/µl)
- 12 µl 3 x Ligase-Puffer
- 3 µl ATP (150 µM, frisch verdünnt)
- 10 µl [5'-³²P]pCp
- 3 µl T4-RNA-Ligase (10 U/µl)

3.3.6 5'-Markierung von RNA

Die Markierung des 5'-Endes der RNA erfolgt durch Kinasierung einer radioaktiven Phosphatgruppe an die 5'-Hydroxylgruppe. Dazu muß zuerst die nach der Transkription vorhandene Triphosphatgruppe der RNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase abgespalten werden. Es wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps verwendet, da sie durch Erhitzen auf 80 °C für 10 min für die anschließende Kinasierung inaktiviert werden kann. Die T4-Polynukleotid-Kinase kann nun den radioaktiven Phosphatrest vom [γ -³²P]-ATP auf die RNA übertragen. Nach beendeter Reaktion reinigt man über ein 12 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel auf und fällt die RNA mit Ethanol.

Dephosphorylierung:

- 7 µl RNA (2 pmol/µl)
- 1 µl 10 x Phosphatase-Puffer
- 2 µl alkalische Phosphatase, Shrimps (1 U/µl)

Inkubation bei 37 °C / 1h

- 3 µl EDTA (0,1 M)
- 80 °C / 10 min, anschließend 0 °C / 5min

Kinasierung:

- 23 µl Dephosphorylierungsansatz
- 3 µl H₂O
- 5 µl 10 x Kinase-Puffer
- 1,6 µl DTT (100 mM)
- 3 µl MgCl₂ (100 mM)
- 10 µl [γ -³²P]-CTP
- 4 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)

3.3.7 Nukleolytische Spaltung von RNA

Es gibt viele Ribonukleasen, die RNA in Abhängigkeit von ihrer Sekundärstruktur schneiden. Aus dem Spaltungsmuster einer limitierten Spaltung mit diesen RNasen sollte daher eine Aussage über die Sekundärstruktur der zu untersuchenden RNA möglich sein. Die Enzymkonzentration und die Inkubationsdauer müssen dabei so gewählt werden, daß kein vollständiger Verdau der RNA auftritt. Etwa 50 % der eingesetzten RNA sollte unverdaut bleiben, damit statistisch nur eine Spaltung pro Molekül auftritt.

Vor der enzymatischen Spaltung wurde die RNA wie auch während der Selektion für 5 min bei 90 °C in Bindungspuffer denaturiert und anschließend in 20 min auf RT abgekühlt. Die Spaltungsreaktionen wurden in einem Volumen von 6 µl in silikonisierten Eppendorfgefäßen durchgeführt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 6 µl Probenpuffer gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. 5µl des Reaktionsansatzes werden auf einem 25 %-igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Spaltung mit Ribonuklease T₁:

Ribonuklease T₁ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet spezifisch einzelsträngige RNA auf der 3'-Seite von Guanosinnukleotiden (Gp↓Np). Diese Nuklease ist in der Lage unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) zu spalten. Die Spaltung unter denaturierenden Bedingungen ermöglicht eine spätere Zuordnung der Basen auf dem Autoradiogramm, während man aus der nativen Spaltung Aufschluß über einzelsträngige Regionen erhalten kann.

denaturierende Spaltung:

2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
 1 µl t-RNA (6 µg/µl)
 2 µl T₁-Spaltungspuffer
 0,4 µl H₂O
 0,6 µl RNase T₁
 20 min / 55 °C

native Spaltung:

2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
 3 µl t-RNA (6 µg/µl)
 0,7 µl H₂O
 0,3 µl RNase T₁
 20 min / Raumtemperatur

Spaltung mit Ribonuklease T₂:

Ribonuklease T₂ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet sequenzunabhängig einzelsträngige RNA unter Freisetzung von Oligonukleotiden mit 3'-Phosphatgruppen. RNase T₂ kann daher in Kombination mit RNase S₁ für die Identifizierung nicht basengepaarter Bereiche eingesetzt werden.

native Spaltung:

- 2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
- 3 µl t-RNA (6 µg/µl)
- 0,7 µl H₂O
- 0,3 µl RNase T₂ (5,75 U/µl)
- 20 min / Raumtemperatur

Spaltung mit Ribonuklease S₁:

Die Nuklease S₁ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet wie die RNase T₂ sequenzunabhängig einzelsträngige Bereiche der RNA. Im Gegensatz zur RNase T₂ werden hier jedoch Oligonukleotid-5'-phosphate freigesetzt.

native Spaltung:

- 2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
- 3 µl t-RNA (6 µg/µl)
- 0,7 µl H₂O
- 0,3 µl RNase S₁ (0,4 U/µl)
- 20 min / Raumtemperatur

Spaltung mit Ribonuklease V₁:

Mit der Ribonuklease V₁ (Cobra Venom) lassen sich bevorzugt doppelsträngige Bereiche der RNA sequenzunabhängig spalten. Wie bei der Spaltung mit RNase S₁ werden auch hier Oligonukleotid-5'-phosphate freigesetzt.

native Spaltung:

- 2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
- 3 µl t-RNA (6 µg/µl)
- 0,6 µl H₂O
- 0,4 µl RNase V₁ (0,72 U/µl)
- 20 min / Raumtemperatur

3.3.8 Partielle alkalische Hydrolyse von RNA

Unter alkalischen Bedingungen ist RNA im Gegensatz zur DNA instabil. Über einen zyklischen 2',3'-Phosphat-Übergangszustand entstehen Spaltprodukte mit einer 5'-Hydroxylgruppe. Durch eine zeitliche Begrenzung der alkalische Hydrolyse kann man die RNA so spalten, daß Oligoribonukleotide jeder möglichen Länge entstehen. Trägt man dieses Reaktionsgemisch auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel auf, so erhält man nach der Autoradiographie eine Alkalileiter, die für die Zuordnung der Spaltprodukte der enzymatischen RNA-Spaltung verwendet werden kann. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl Probenpuffer gestoppt und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt.

Reaktionsansatz:

- 3 μ l RNA (ca. 150000 cpm)
- 1,5 μ l t-RNA (6 μ g/ μ l)
- 4,5 μ l Alkali-Puffer (50 mM NaOH, 1 mM EDTA, frisch angesetzt)
- 45-60 sec / 120 °C

3.4 Vorbereitung der Affinitätschromatographie

3.4.1 Immobilisierung der Peptide auf Sepharose

Für die affinitätschromatographische Selektion müssen die Peptide auf einem Trägermaterial immobilisiert werden. Die Immobilisierung soll reversibel sein, um eine Elution der spezifisch bindenden RNA als RNA-Peptid-Komplex zu ermöglichen. Daher sollen die Peptide über Disulfidbrücken an Thiopropyl-Sepharose 6B gekoppelt werden. Um das zu ermöglichen, müssen die Peptide eine freie Thiolgruppe besitzen, weshalb das β A4(1-40) und β A4(1-16) mit einem Cystein am N-terminalen Ende synthetisiert wurden und folglich 41 bzw. 17 Aminosäuren enthalten.

Zum Quellen suspendiert man 1,4 g Thiopropyl-Sepharose 6B in 30 ml Wasser und schwenkt für 15 min. Alle verwendeten Lösungen sollten vor der Benutzung durch 10 min Ultraschallbehandlung entgast werden, um eine Oxidation der Sulfidgruppen durch Luftsauerstoff zu vermeiden. Man filtriert ab und wäscht mit 3 x 50ml Wasser. Das gequollene Gel wird in 25 ml einer Lösung aus 88 μ M β A4(1-16), 12 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA suspendiert und für 1,5 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Bei der Immobilisierung des β A4(1-40) muß aufgrund der großen Tendenz zur Aggregation und der damit verbundenen Unlöslichkeit die Immobilisierung in einer 60 %-igen Hexafluorisopropanollösung (HFIP) durchgeführt werden. Dazu suspendiert man das Gel in 25 ml einer Lösung aus 45 μ M β A4(1-40), 10 mM Tris-HCl, pH 7,7 und schwenkt für 1,5 h bei RT.

Man filtriert das Gel ab und wäscht mit 2 x 50 ml einer 0,1 M Natriumacetatlösung, pH 6,0. Um von nicht reagierten Thiolgruppen des Gels die Schutzgruppen abzuspalten und die reaktiven Thiolgruppen zu blockieren, wurde das Gel für 45 min unter Schwenken in 20 ml 2-Mercaptoethanol (5 mM, 0,1 M NaOAc, pH 6) suspendiert. Das Säulenmaterial wird zweimal mit 50 ml Bindungspuffer gewaschen und bei 4 °C unter Bindungspuffer aufbewahrt.

Für die Vorsäule wurde das Säulenmaterial wie oben beschrieben behandelt, jedoch ohne die Zugabe des Peptids. Hier wurden alle Thiopyridylgruppen durch 2-Mercaptoethanol substituiert.

3.4.2 Bestimmung der Peptidkonzentration auf dem Säulenmaterial

Zur Bestimmung der Beladung des Säulenmaterials wurde das Peptid von 100 μl Säulenmaterial durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken abgespalten. Dazu eluiert man das Peptid von der Säule, indem man zweimal 500 μl Elutionspuffer langsam durch die Säule fließen läßt (30 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Konzentration des Peptids im Eluat wurde auf zwei Arten bestimmt.

Protein-Assay

Die Konzentration des Peptids im Eluat konnte beim $\beta\text{A4}(1-16)$ durch den Coomassie-Protein-Assay bestimmt werden. Dazu gibt man 500 μl des Eluats mit 500 μl Coomassielösung (Pierce) zusammen, schüttelt und mißt die Absorption in einer 1 ml-Einwegküvette bei 595 nm. Die Konzentration erhält man bei Vergleich mit einer Eichkurve, die bei verschiedenen bekannten Konzentrationen aufgenommen wurde. Da die Absorption nicht zeitlich konstant ist, ist es wichtig, daß die Messung immer nach der gleichen Zeit nach der Zugabe der Coomassielösung durchgeführt wird. Aufgrund der Aggregation in wäßrigen Lösungen, konnte die Peptidkonzentration des $\beta\text{A4}(1-40)$ nicht durch den Proteinassay bestimmt werden und wurde deshalb durch Aminosäureanalyse ermittelt.

Aminosäureanalyse

200 μl des Eluats (1 ml) wurden in einem Dansylgläschen zur Trockne eingengt und durch Gasphasenhydrolyse sauer hydrolysiert. Dazu stellt man das Dansylgläschen in ein 40 ml Gefäß mit Schraubverschluß und Hahn zu etwa 3 ml 5,7 M Salzsäure. Durch Evakuieren des Gefäßes und Erhitzen auf 150 °C für 1 h wird die Probe hydrolysiert. Man engt die Probe im Vakuum ein und nimmt sie in 100 μl Wasser auf. 20 μl dieser Lösung wurden für die Aminosäureanalyse nach den Kopplungsschritten des Edman-Abbaus mit Phenylisothiocyanat derivatisiert. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte durch HPLC auf einer ABI PTH RP C18 Säule (5 μm , 220 x 2,1 mm) mit einem binären Gradientensystem (Puffer A: H_2O , Puffer B: 5 % w/v Tetrahydrofuran, 6 mM Natriumacetat, pH 4,2). Die Stoffmengen der Aminosäuren des Peptids wurden durch Vergleich der Peakhöhe der Aminosäuren mit einer

Referenzsubstanz bekannter Konzentration berechnet. Nach Division der Stoffmenge durch die Anzahl der Reste im Peptid und Mittelung über 10 Aminosäuren erhält man die Konzentration des Peptids im Eluat und damit die Beladung des Säulenmaterials. Die Aminosäureanalyse wurde von Dr. Schröder durchgeführt.

3.4.3 Silikonisierung der Säulen

Um die Adsorption der RNA an der Oberfläche der Säulen bzw. der Fritten möglichst gering zu halten, wurden diese vor der Benutzung silanisiert. Dazu spült man die Säulen mit Toluol und füllt sie anschließend mit einer 5 %-igen Lösung aus Dichlordimethylsilan in Toluol. Nach ein bis zwei Stunden wird diese Lösung entfernt, die Säulen mit Toluol und anschließend mit Wasser mehrmals gründlich gewaschen.

3.4.4 Optimierung des Bindungspuffers

Um nichtspezifische Wechselwirkungen der RNA zu unterdrücken, wurde die Salzkonzentrationen im Bindungspuffer auf das Säulenmaterial abgestimmt. Dazu wurde die NaCl-Konzentration zwischen 150-500 mM und die MgCl₂-Konzentration im Bereich von 5-50 mM variiert. Die Bedingungen, unter denen am wenigsten RNA auf der Säule gebunden wurde, sollten für die Selektion verwendet werden.

3.4.5 Durchführung der *in vitro*-Selektion

Die Selektion der hochaffinen RNA-Moleküle wurde affinitätschromatographisch auf kleinen Säulen (Mobicols, Mo Bi Tec) mit 100 µl Säulenvolumen durchgeführt. In jeder Selektionsrunde wurde eine Vorsäule (ohne Peptid) und eine Hauptsäule (Affinitätssäule) verwendet. Die radioaktiv markierte RNA wurde in Bindungspuffer auf eine Konzentration von 2,5 µM eingestellt. Damit die RNA in ihrer stabilen Konformation vorliegt, denaturiert man für 5 min bei 90 °C und renaturiert durch 20 minütiges Abkühlen auf Raumtemperatur. 200 µl dieser RNA trägt man auf die Vorsäule auf. Lediglich in der ersten Selektionsrunde wurde aufgrund der großen RNA-Menge von diesem Protokoll abgewichen und bei einer doppelt so großen Konzentration ca. 2,5 nmol RNA eingesetzt. Das Säulenvolumen der Hauptsäule wurde auf 250 µl vergrößert. Die Vor- und Hauptsäule wurde in der ersten Runde mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen, während sie in allen folgenden Runden nur noch mit 2 ml Puffer gewaschen wurde. Im Anschluß wurde das Peptid mit der bindenden RNA nach

Entfernung der Vorsäule mit 1 ml Elutionspuffer von der Säule in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß eluiert.

Um einen möglichst konstanten Fluß durch die Säule zu erhalten, wurde eine Peristaltikpumpe eingesetzt. Der Bindungspuffer wurde in 500 µl Portionen auf die Säule gegeben und gelangt durch Anlegen eines leichten Überdrucks mit Hilfe der Pumpe durch die Vorsäule auf die Hauptsäule. Nun wird die Pumpe erst an die Hauptsäule angeschlossen, bevor die nächste Portion Puffer auf die Vorsäule aufgetragen werden kann. Der Fluß durch die Säulen soll etwa 33-35 µl/min betragen.

Nach beendeter Elution wird die RNA-Konzentration der Wasch- und Elutionslösung sowie der Säulen durch Cerenkov-Zählung bestimmt. Das Eluat wird in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 400 µl eingeeengt und zur Entfernung des Peptids mit Phenol und Chloroform extrahiert. Mit Ethanol unter Zusatz von Glycogen (40 µg) wird die RNA gefällt und anschließend revers transkribiert. Die DNA wird durch PCR amplifiziert und für die nächste Selektionsrunde durch Transkription in RNA umgeschrieben. Wenn kein weiterer Anstieg der spezifisch eluierten RNA mehr beobachtet wird, kann die Selektion abgebrochen werden. Um das Gemisch der unterschiedlichen Sequenzen analysieren zu können, separiert man die Sequenzen durch Klonierung in Bakterienzellen.

3.4.6 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die affinitätschromatographische Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe von Econo-Säulen (Bio-Rad) durchgeführt, da diese ein größeres Volumen besitzen, als die während der Selektion verwendeten Mobicols. Ein genügend großes Säulenbettvolumen ist entscheidend, damit die aufgetragene Menge RNA (10 µl, 100 nM) als scharfe Bande durch die Säule wandern kann. Es wurde mit 800 µl Säulenmaterial gearbeitet, wodurch sich ein Säulenvolumen von 810 µl ergibt (Volumen des Hahns etc.). Nach Auftragen der radioaktiv markierten RNA wäscht man die Säule solange mit Bindungspuffer, bis keine Radioaktivität mehr auf der Säule detektiert werden kann. Anfangs fängt man das Eluat tropfenweise auf, um das Totvolumen möglichst genau bestimmen zu können. Später genügen 500 µl Fraktionen. Durch Einsatz einer Pumpe und eines Fraktionssammlers kann die Bestimmung automatisiert werden.

3.5 Mikrobiologische Methoden

Für die Transformation von *Epicurian Coli* Zellen muß die DNA in einen Vektor ligiert werden. Verwendet wurde hier der pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene), ein Abkömmling des pBluescript II SK(+) phagemids, der ein Gen für Ampicillinresistenz sowie einen *lac* Promotor und einen T7-RNA Polymerase Promotor enthält. Innerhalb des SK *multiple cloning sites* befindet sich eine seltene *Srf I*-Schnittstelle (5'-GCCC|GGGC-3'), die eine Ligation der blunt-ended PCR-Produkte der Selektion mit dem geschnittenen Vektor ermöglicht. Da für die PCR standardmäßig die *Pfu* DNA Polymerase verwendet wurde, ist eine Aufarbeitung der DNA nicht nötig. Anders wäre das bei Verwendung von *Taq* Polymerase, da diese häufig eine weitere Base an das Kettenende hängt. Die Restriktionsspaltung des Vektors, sowie die Ligation des DNA-Inserts können gleichzeitig in einem Gefäß durchgeführt werden. Durch die gleichzeitige Aktivität des Restriktionsenzym und der Ligase liegt ein Gleichgewicht zwischen geschnittenem und ungeschnittenem Vektor vor, bis durch Ligation des Insertes die *Srf I* Restriktionsschnittstelle verloren geht, und der Vektor nicht mehr gespalten werden kann.

Diese Plasmide werden nun in superkompetente *Epicurian Coli* Zellen XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene) eingeführt und auf Agarplatten ausgestrichen, die X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β ,D-galactopyranosid), IPTG (Isopropylthio- β ,D-galactosid) sowie das Antibiotikum Ampicillin enthalten. Aufgrund des Antibiotikums können nur die Zellen auf dem Medium wachsen, die durch Aufnahme eines Plasmids eine Ampicillinresistenz besitzen. Die Zellen, die ein nicht rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, besitzen ein intaktes Gen für die β -Galactosidase, die durch Spaltung des X-Gals einen blauen Farbstoff freisetzt. Diese Zellen färben sich blau. Die weißen Kolonien stellen die transformierten Bakterien dar, die genau ein rekombinantes Plasmid enthalten, das beliebig vermehrt werden kann.

3.5.1 Ligation

Vor der Ligation wird die DNA unter Zugabe des gleichen Volumens einer 4 M Ammoniumacetatlösung (anstelle des Natriumacetats) und des 2,5 fachen Volumens an Ethanol gefällt. Das Pellet wird in TE-Puffer aufgenommen.

Das Verhältnis von Insert : Plasmid soll zwischen 40 : 1 und 100 : 1 liegen. Es wurde ein Verhältnis von 70 : 1 gewählt, was einer Menge von 364 fmol Insert pro Standardansatz entspricht.

Ligationsansatz:

- 1 µl pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (10 ng/µl)
- 1 µl 10 x PCR-Script-Puffer
- 0,5 µl ATP(10 mM)
- 3 µl PCR Produkt (364 fmol)
- 1 µl *Srf I* Restriktionsenzym (5 U/µl)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl)
- ad 10 µl mit H₂O auffüllen

Man läßt eine Stunde bei RT reagieren, erhitzt für 10 min auf 65 °C und stellt die Probe bis zur Transformation auf Eis.

3.5.2 Transformation

Durch eine spezielle Salzbehandlung ist es möglich, Zellmembranen DNA-permeabel (kompetent) zu machen und zu einer Aufnahme eines Plasmids zu bringen. Für die Transformation wurden jedoch käuflich erhältliche kompetente Zellen verwendet. Diese sind schon gegenüber kleinen Temperaturschwankungen sehr empfindlich und müssen deshalb immer bei -80 °C gelagert werden bzw. während des Aliquotierens permanent auf Eis stehen. Weiterhin ist es wichtig, die Dauer des 45 s Temperaturintervalls genau einzuhalten. Etwa ½ h vor dem Ausstreichen der Zellen sollten die ampicillinhaltigen Agarplatten (100 µg/ml) mit 20 µl IPTG (0,2 M) und 20 µl X-Gal (10 % (w/v) in DMF) überschichtet werden. Man bereitet je Transformationsansatz drei Agarplatten vor, trägt jeweils 100, 150, bzw. 200 µl Ansatz auf und verstreicht ihn mit einem gebogenen Glasstab auf der Agaroberfläche. Die Agarplatten läßt man etwa 18 h im Brutschrank bei 37 °C inkubieren.

Transformationsansatz:

- 40 µl Epicurian Coli XL1-Blue MRF' Kan superkompetente Zellen
- 0,7 µl β-Mercaptoethanol (1,5 M)
- 10 min auf Eis inkubieren, alle 2 min schütteln
- 2 µl Ligationsansatz
- 30 min auf Eis inkubieren
- 45 sec / 42 °C, direkt anschließend auf Eis
- 450 µl SOC-Medium (vorgewärmt auf 42 °C)
- 37 °C / 1 h schütteln
- auf Agarplatten mit X-Gal, IPTG und Ampicillin ausstreichen, 37 °C / 18 h inkubieren

3.5.3 Isolierung der Plasmide

Die nach der Transformation auf der Agarplatte erhaltenen weißen Klone werden mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens (Zahnstocher) gepickt und in 3 ml Übernachtskultur bei 37 °C im Schüttelwasserbad vermehrt. Von jeder Kultur wird eine Glycerinkultur für eine eventuelle

spätere Verwendung aufbewahrt. Dazu homogenisiert man 0,5 ml einer Kultur mit dem gleichen Volumen Glycerin, friert die Probe in flüssigem Stickstoff ein und lagert sie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die restlichen 2,5 ml werden in zwei Portionen in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen bei 13000 Upm, 2 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 500 μl STE-Puffer unter Schütteln suspendiert. Man pelletiert erneut und suspendiert anschließend für 10 min in 100 μl Lysatlösung I. Man gibt 200 μl Lysatlösung II zu und schwenkt die Proben vorsichtig während der 20 minütigen Inkubation auf Eis. In diesem Schritt erfolgt die Lysis der Zellen. Durch Zugabe von 150 μl Lysatlösung III wird die chromosomale DNA bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 15 min gefällt. Dabei dürfen die Proben nur vorsichtig gemischt werden (nicht vortexen), um ein Zerreißen der DNA durch die Scherkräfte zu vermeiden. Die Zelltrümmer und die chromosomale DNA werden bei 13000 Upm / 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Man extrahiert mit Phenol (pH 4,5-5) und Chloroform, fällt mit Ethanol und löst das Pellet in 50 μl TE-Puffer. Da in diesen Proben die mRNA der Zelle noch enthalten ist, diese das Ergebnis der Sequenzierung auf einem ABI-Sequencer jedoch stört, muß noch ein RNA-Verdau durch Zugabe von 250 μl S1-Puffer aus dem Plasmid-Isolierungs-kit (siehe unten) durchgeführt werden. Man fällt erneut mit Ethanol und löst die Probe in 50 μl Wasser.

Alternativ zu dieser Isolierung wurde auch ein Kit (Nucleobond AX20, Macherey-Nagel) verwendet. Hierbei wurde entsprechend der Vorschrift vorgegangen.

Die Reinheit und die Größe der Plasmide wurden gelelektrophoretisch auf einem 1 %-igem Agarosegel überprüft (siehe 3.2.1).

3.6 Charakterisierung der Aptamere

Die Primärstrukturen der Aptamere wurden mit Hilfe eines Computerprogramms auf homologe Bereiche untersucht. Dazu wurde ein Programm in Pascal geschrieben, das die Sequenzen als Textdatei einliest und auf Motive variabler Länge hin vergleicht. Es werden alle Motive die mehrmals auftreten mit der Nummer der Sequenzen in denen sie vorgefunden wurden in einer Textdatei ausgegeben. Diese Datei kann mit einem Textverarbeitungsprogramm bearbeitet oder ausgedruckt werden.