

# Selektion und Charakterisierung von PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen Aptameren



## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Britta Höhn**

aus Hagen

**Juli 2006**

Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis März 2006 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Volker A. Erdmann angefertigt. Die Verfasserin versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Disputation am 11.12.2006

Litterarum radices amaras esse, fructus iucundiores.

(Das Wissen hat bittere Wurzeln, aber seine Früchte sind umso süßer.)

Cato d. Ältere (Diomedes 1, 310, 3 K)

**Für Marco**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	<b>Prionkrankheiten</b>	1
1.2	<b>Das Prionprotein (PrP)</b>	3
1.3	<b>Diagnose von Prionkrankheiten</b>	5
1.3.1	Notwendigkeit für eine präsymptomatische Diagnose	5
1.3.2	Gegenwärtige Diagnose-Techniken	6
1.3.3	Neue Diagnose-Strategien	7
1.3.4	Antikörper gegen das Prionprotein	8
1.4	<b>In vitro Selektion von Aptameren</b>	9
1.4.1	Selektionszyklus	10
1.4.2	DNA-Bibliotheken	12
1.5	<b>Aptamere und ihre Anwendungen</b>	13
1.6	<b>Aptamere gegen das Prionprotein</b>	15
1.7	<b>Aptamer versus Antikörper</b>	16
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	18
3.1	<b>Material</b>	18
3.1.1	Geräte	18
3.1.2	Verbrauchsmaterial	19
3.1.3	Chemikalien	19
3.1.4	Sonstiges	20
3.1.5	Enzyme	21
3.1.6	Kits	21
3.1.7	Zellen und Plasmide	21
3.1.8	Radioisotope	21
3.1.9	Software	22
3.1.10	Medien	22
3.1.11	Puffer	22
3.2	<b>Methoden</b>	25
3.2.1	<b>Nucleinsäure-Reinigung</b>	25
3.2.1.1	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	25
3.2.1.2	<i>Ethanol-Präzipitation</i>	25
3.2.1.3	<i>Gelfiltration</i>	26
3.2.1.4	<i>Spin-Filtration</i>	26
3.2.1.5	<i>Gelelution</i>	27
3.2.2	<b>Gelelektrophorese</b>	27
3.2.2.1	<i>Agarosegele</i>	28
3.2.2.2	<i>Denaturierende Harnstoff-PAGE</i>	28
3.2.2.3	<i>Gele für die Spaltungsanalyse</i>	29
3.2.2.4	<i>Silikonisierung</i>	29
3.2.2.5	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	30
3.2.3	<b>Nachweismethode für Nucleinsäuren in Gelen</b>	31
3.2.3.1	<i>Ethidiumbromidfärbung</i>	31
3.2.3.2	<i>UV-Shadowing</i>	32
3.2.3.3	<i>Autoradiographie</i>	32

3.2.3.4	<i>Messung der Radioaktivität</i>	32
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	33
3.2.4.1	<i>Optische Dichte</i>	33
3.2.4.2	<i>Lambert-Beersches Gesetz</i>	33
3.2.5	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.5.1	<i>DNA-Amplifikation</i>	34
3.2.5.2	<i>Präparative PCR</i>	34
3.2.5.3	<i>PCR zur Erzeugung der ssDNA-Bibliothek 2</i>	36
3.2.5.4	<i>PCR nach reverser Transkription</i>	36
3.2.5.5	<i>PCR zur Amplifikation klonierter Sequenzen</i>	37
3.2.5.6	<i>PCR zur Verkürzung des Aptamers S3-20</i>	37
3.2.5.7	<i>In vitro T7-Transkription</i>	38
3.2.5.8	<i>Reverse Transkription</i>	39
3.2.5.9	<i>Klonierung</i>	40
3.2.5.10	<i>DNA-Ligation</i>	40
3.2.5.11	<i>Transformation kompetenter Zellen</i>	41
3.2.5.12	<i>Selektion der positiven Klone</i>	42
3.2.5.13	<i>Plasmid-Präparation</i>	42
3.2.5.14	<i>DNA-Sequenzierung</i>	42
3.2.5.15	<i>Markierung von Oligoribonucleotiden</i>	43
3.2.5.16	<i>Dephosphorylierung</i>	44
3.2.5.17	<i>Nucleolytische Spaltung von Ribonucleinsäuren</i>	44
3.2.5.18	<i>Spaltung mit Ribonuclease T1 (RNase T1)</i>	45
3.2.5.19	<i>Spaltung mit Ribonuclease A (RNase A)</i>	45
3.2.5.20	<i>Spaltung mit Nuclease S1</i>	45
3.2.5.21	<i>Spaltung mit Ribonuclease VI (RNase VI)</i>	46
3.2.5.22	<i>Partielle alkalische Hydrolyse von Ribonucleinsäuren</i>	46
3.2.6	Überexpression und Reinigung von PrP <sup>C</sup>	47
3.2.6.1	<i>In vivo Überexpression</i>	47
3.2.6.2	<i>Reinigung und Faltung von PrP<sup>C</sup></i>	48
3.2.6.3	<i>Dialyse</i>	49
3.2.6.4	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	49
3.2.7	Durchführung der <i>in vitro</i> Selektion	50
3.2.7.1	<i>SELEX 1 gegen PrP<sup>27-30</sup>, Gegenselektion gegen PrP<sup>C</sup> (Bibliothek 1)</i>	51
3.2.7.2	<i>SELEX 2 gegen PrP<sup>27-30</sup> (Bibliothek 2)</i>	52
3.2.7.3	<i>SELEX 3 gegen Peptid 1 / Peptid 2 (Bibliothek 3)</i>	52
3.2.7.4	<i>SELEX 4 gegen in vitro aggregierte PrP-Oligomere (Bibliothek 4)</i>	53
3.2.8	Charakterisierung der selektierten RNA	54
3.2.8.1	<i>Scintillation Proximity Assay (SPA)</i>	54
3.2.8.2	<i>Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Oberflächen-Plasmonenresonanz Spektroskopie (SPR)</i>	55
3.2.8.3	<i>Bindungsaffinitäten gegen zelluläres PrP<sup>C</sup> und oligomeres PrP</i>	57
3.2.8.4	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	59
3.2.8.5	<i>Bindungsmotiv- und sekundär Strukturanalyse erhaltener Sequenzen</i>	60
3.2.9	Biophysikalische Methoden	60
3.2.9.1	<i>Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie</i>	60
3.2.9.2	<i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i>	61

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	62
4.1	<b>Überexpression und Reinigung des zellulären PrP<sup>C</sup></b>	62
4.2	<b>In vitro Selektion</b>	64
4.2.1	SELEX 1 gegen PrP <sup>27-30</sup> , Gegenselektion gegen PrP <sup>C</sup>	64
4.2.1.1	<i>Erstellung der Bibliothek 1 (RNA)</i>	64
4.2.1.2	<i>Durchführung der SELEX 1</i>	66
4.2.2	SELEX 2 gegen PrP <sup>27-30</sup>	69
4.2.2.1	<i>Erstellung der Bibliothek 2 (DNA)</i>	69
4.2.2.2	<i>Durchführung der SELEX 2</i>	70
4.2.2.3	<i>Elektronenmikroskopische Charakterisierung von PrP<sup>27-30</sup></i>	71
4.2.3	SELEX 3 gegen konformationsspezifische Epitope des Prionproteins	73
4.2.3.1	<i>Auswahl der Epitope</i>	73
4.2.3.2	<i>Physikalische Charakterisierung der Peptide 1 und 2</i>	76
4.2.3.3	<i>Erstellung der Bibliothek 3 (RNA)</i>	77
4.2.3.4	<i>Optimierung der Selektionsbedingungen für SELEX 3</i>	78
4.2.3.5	<i>Durchführung der SELEX 3</i>	80
4.2.3.6	<i>Identifizierung von Peptid 1-spezifischen Aptameren mittels Scintillation Proximity Assay (SPA)</i>	81
4.2.3.7	<i>Sequenzanalyse der SELEX 3</i>	83
4.2.3.8	<i>Charakterisierung des Klons S3-20</i>	91
4.2.3.9	<i>Bestimmung der Dissoziationskonstante der Aptamere aus SELEX 3 an Peptid 1</i>	94
4.2.3.10	<i>Bestimmung der apparnten Dissoziationskonstante der Aptamere aus SELEX 3 an monomeres bzw. oligomeres Prionprotein</i>	97
4.2.4	SELEX 4 gegen <i>in vitro</i> aggregierte PrP-Oligomere O1	99
4.2.4.1	<i>Auswahl des Targets</i>	99
4.2.4.2	<i>Charakterisierung des Oligomers O1</i>	100
4.2.4.3	<i>Erstellung der Bibliothek 4 (RNA)</i>	102
4.2.4.4	<i>Durchführung der SELEX 4</i>	103
4.2.4.5	<i>Sequenzanalyse der SELEX 4</i>	104
4.2.4.6	<i>Bindung der Aptamere aus SELEX 4 an oligomeres bzw. monomeres Prionprotein</i>	109
4.2.4.7	<i>Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten der Aptamere der SELEX 4 gegen oligomeres bzw. monomeres Prionprotein</i>	110
4.3	<b>Einfluss von RNA auf die Struktur von PrP<sup>C</sup></b>	112
4.3.1	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	112
4.3.2	Dynamic Light Scattering (DLS)	116
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	119
5.1	<b>Diagnose der Prionkrankheiten</b>	119
5.2	<b>Selektion gegen infektiöses PrP<sup>27-30</sup></b>	120
5.3	<b>Selektion gegen konformationsspezifische Epitope</b>	123
5.3.1	Affinität für PrP-Oligomere	126
5.3.2	Spezifität	128
5.4	<b>Selektion gegen PrP-Oligomere</b>	130
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	134
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	136

<b>8 Literaturverzeichnis</b>	138
<b>9 Anhang</b>	156
<b>9.1 Sequenzen der verwendeten Bibliotheken und Primer</b>	156
<b>9.2 Peptide</b>	157
<b>9.3 PrP<sup>C</sup> <i>Mesocricetus aureus</i> (Goldhamster) 1-254</b>	157
<b>9.4 inklonierte Sequenzen zur Überexpression des Prionproteins</b>	158
9.4.1 Prnp <i>mesocricetus aureus</i> (90-231)	158
9.4.2 Prnp <i>mesocricetus aureus</i> (23-231)	158
<b>9.5 Abkürzungsverzeichnis</b>	159
<b>9.6 Physikalische Einheiten</b>	160
<b>9.7 Präfixe für Einheiten</b>	160
<b>9.8 Eigene Veröffentlichungen</b>	161
<b>9.9 Danksagung</b>	162