

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer	BioRad
Autoklav	Sterico, Vapoklav 500-D
Biacore X	BIACORE
CD-Spektropolarimeter J-600	JASCO
Dewar-Gefäße	Hampton Research / Roth
Eisschrank -20°C	Heraeus
Eisschrank -80°C	Bosch
Elektrophoresekammer und entsprechende Nachbauten	Renner, IBI
ELISA Messgerät Sunrise	Tecan
Feinwaage	Mettler AC 88
Gel-Dokumentationsanlage GelDoc 2000	BioRad
Geltrockner	Biometra
Hamilton Spritzen	Hamilton
Heizblock	Bioblock Scientific
Heizschrank	Heraeus, B 5042
Heizschrank Horo	Dr. Hoffmann GmbH
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman
Labofuge 400	Heraeus
Lyophilisator	Heraeus-Christ, Savant
Magnetic Particle Separator	Roche
Magnetrührer	IKAMAG RCT
Mini Protean II™	BioRad
Ölpumpe, 10004 AC	Alcatel
PCR-Gerät, Tpersonal	Biometra
Peristaltikpumpe Minipuls 2	Gilson
pH-Meter	Knick, Ingold Elektrode
Photometer UV-1202	Shimadzu
Pipetten Gilson-Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000, P5000	Gilson
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Röntgenfilmcassetten X-Omatic mit Regular-Verstärkerfolien	Kodak
Rotor JA-17, GS-3, GSA	Beckmann
Schüttler G76 (Mikrobiologie)	New Brunswick Scientific
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries
Sequenziergelkammer, Model S2	Life Technologies, Gibco BRL
Spannungsquelle ECPS 3000/150	Pharmacia
Spectroscatterer 201	RiNA GmbH
Szintillationszähler LS 6000 SC	Beckman
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf / Qualitron Inc.
Ultraschall-Gerät	Bioblock Scientific
Ultratorax	Janke & Kunkel KG
Ultrazentrifuge L8-55M	Beckman
Ultrazentrifuge CS-150 GX	Hitachi
UV-Monitor Reprostar II	CAMAG
Vakuumpumpe Drehschiebervakuumpumpe RC5	Vacuubrand
Vakuumentrifugen Speed Vac Concentrator	Savant
Waage 1401 MP8, (2200 g)	Sartorius
Wasserbad	B. Braun
Zentrifuge Biofuge 13R	Heraeus Sepatech
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus Sepatech
Zentrifuge J2-21	Beckman

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

96 well Platte Maxi Sorb  
 Dialysemembran SpectraPor®  
 Entwickler G150  
 Filter, 10 µm  
 Filterhalter  
 Fixierer G350  
 Glasplatten  
 Handschuhe  
 Kimwipes®  
 Microcon, Centricon  
 Nap 5, 10, 25-Säulen  
 Nick-Säulen  
 Nitrozellulose Membran 0,05 µm, 0,2 µm  
 Nitrozellulosefilter Protran BA83, 0,2 µm  
 PCR-Tubes  
 Petrischalen  
 Pipettenspitzen P2 C-10  
 Pipettenspitzen P20/P200, P1000  
 Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml silikonisiert  
 Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml  
 Reaktionsröhrchen mit Schraubdeckel 12 ml, 50 ml  
 Röntgenfilme Medical X-Ray Film RX  
 Säulen Mobicols  
 Szintillationsflüssigkeit Ready Protein+™  
 Sensor Chip SA  
 Silikonfett  
 Spritzen  
 Spritzenfilter 25 mm, PP, steril, 0,2 µm, Nylon  
 Szintillationsröhrchen 20 ml Polyvial  
 Zentrifugengefäße 1,5 ml  
 Zentrifugenröhrchen

Nunc  
 Roth  
 Agfa-Gefaert N. V.  
 Mobitec  
 Sartorius, Fisher  
 Agfa-Gefaert N. V.  
 Glaserei Graw & Meibert  
 Ansell  
 Kimberly-Clark  
 Amicon, Millipore  
 GE Healthcare  
 GE Healthcare  
 Millipore  
 Schleicher & Schüll  
 Roth  
 Greiner  
 Gilson  
 Greiner Labortechnik  
 Roth  
 Eppendorf  
 Greiner  
 Fuji  
 Mobitec  
 Beckman Coulter  
 BIACORE  
 Roth  
 B. Braun  
 Roth  
 Zinsser Analytic  
 Beckman  
 Roth

### 3.1.3 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)  
 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β,D-galactopyranosid (X-gal)  
 Aceton  
 Acetonitril  
 Acrylamid  
 Agar  
 Agarose  
 Ammoniak (33%)  
 Ammoniumchlorid  
 Ammoniumperoxodisulfat  
 Ammoniumsulfat  
 Ampicillin  
 APS  
 Borsäure  
 Bromphenolblau  
 Calciumchlorid  
 Calciumsulfat  
 Chloroform/Isoamylalkohol  
 Coomassie  
 Desoxynukleotidtriphosphate  
 Dichlordimethylsilan  
 Dichlormethylsilan  
 Dinatriumhydrogenphosphat  
 DMSO  
 DNA-Leitern

Fluka  
 Bissendorf Biochemicals  
 Roth  
 Merck  
 Roth  
 Gibco BRL  
 Roth  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Fluka  
 Fluka  
 Merck  
 Riedel de Haën  
 Serva  
 Merck  
 Merck  
 Roth  
 Pierce, Roth  
 Bioline  
 Roth  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Promega, Fermentas

EDTA (Ultrapure bioreagent)	Merck
Essigsäure	Sigma Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Fluka
Formamid	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycogen	Fermentas
Glykogen	Fermentas
Guanidin HCl	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Life Technologies
HEPES	Sigma, Roth
Imidazol	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropylthio- $\beta$ ,D-galactosid (IPTG)	Bissendorf Biochemicals
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kupfersulfat	Roth
Magermilchpulver	Socofin
Magnesiumchlorid	Riedel-de Häen
Magnesiumsulfat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Roth
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin	Serva
Natriumacetat	Riedel de Haën
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP, CTP	Promega
p-Aminobenzamidinecelite	Sigma
PEG 35000	Merck
Pepton Nr. 140	Life Technologies
Phenol	Roth
Phenol, Tris gesättigt, pH 7-7,5	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Protein-Marker	Roth
Reduziertes Gluthathion	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Salzsäure	Sigma Aldrich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Spermidin	Sigma Aldrich
Stickstoff (flüssig)	Linde
Substratpuffer	Sigma
Substratablette für Peroxidase	Sigma
TEMED	Sigma Aldrich
Thrombin	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
t-RNA	Roche
Tween 20	Serva
Wasser Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Xylencyanol	Serva Electrophoresis
<i>yeast</i> RNA	Ambion

### 3.1.4 Sonstiges

Anti Maus IgG Peroxidase Conjugate	Sigma
Antikörper 3F4 (Anti-maPrP)	AG Dr. M. Baier, RKI, Berlin
Bradford Färbereagenz	BioRad
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Oligonucleotide siehe Anhang	IBA, Molbiol

Peptide siehe Anhang	Genosphere
PrP-Oligomer (O1)	AG Prof. Dr. C. Betzel, Uni Hamburg
PrP <sup>27-30</sup> , isoliert aus infizierten (Scrapie-Stamm 263K) Hamsterhirnen	AG Dr. M. Baier, RKI, Berlin
StrataClean™ resin	Stratagene
Streptavidin Magnetische Partikel	Roche
Streptavidin-SPA-Beads	Amersham

### 3.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB
Benzonase®	Merck
DNase I	Promega
Lysozym	Sigma
Nuclease S1	Fermentas
PowerScript™ Reverse Transcriptase	BD Biosciences
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase A	Fermentas
RNase T1	Fermentas
RNase V1	Ambion
RNasin (Ribonuclease Inhibitor)	Promega
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-Polynukleotid-Kinase	NEB
T4-RNA-Ligase	NEB
T7-RNA-Polymerase	Stratagene, Calbiochem Novabiochem
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, NEB
ThermoScript™ RNase H-Reverse Transcriptase	Invitrogen
Thrombin	Sigma

### 3.1.6 Kits

NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy® MiniKit	Qiagen
Roti®-Black P (Silberfärbung)	Roth

### 3.1.7 Zellen und Plasmide

<i>E. coli</i> BL21/DE3	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	Promega
pET-15b	Novagen
pGEM®-T	Promega
pRSET A	Invitrogen

### 3.1.8 Radioisotope

[8,9- <sup>3</sup> H]-Biotin	Amersham
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-Adenosin-5'-triphosphat	Amersham
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Cytidin-5'-triphosphat	Amersham
[ $\alpha$ - <sup>3</sup> H]-Cytidin-5'-triphosphat	Amersham
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Cytidin-5',3'-diphosphat	Amersham
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat	Amersham
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Guanosin-5'-triphosphat	Amersham

### 3.1.9 Software

Betriebssoftware zum Spectroscatterer 202 (Photomeasurment, Alldist)  
 BIA Evaluation  
 Bioedit  
 CloneManager 6  
 ClustalX  
 CorelDraw 12  
 Microsoft Excel  
 Microsoft Word  
 Quantity One  
 RNA-FOLD  
 SigmaPlot  
 Standard Analysis für CD-Spektropolarimeter J-600  
 Standard Measurment für CD-Spektropolarimeter J-600

### 3.1.10 Medien

#### *LB-Agarplatten*

- 15 g/l Agar (w/v) in LB-Medium
- Autoklavieren: 20 min, 121°C
  - Zugabe von Ampicillin bei ~50°C  
( $c_{\text{End}} = 100 \mu\text{g/ml}$ )
  - Gießen in sterile Petrischalen

#### *LB-Medium*

- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
 1,0 % (w/v) Pepton Nr. 140  
 1,0 % (w/v) NaCl
- Anpassen des pH auf 7,0 mit NaOH
  - Autoklavieren: 20 min, 121°C

#### *SOC-Medium*

- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
 2,0 % (w/v) Pepton Nr. 140  
 10 mM NaCl  
 2,5 mM KCl
- Autoklavieren: 20 min, 121°C
  - ad 20 mM  $\text{MgCl}_2$
  - ad 20 mM Glucose (steril filtriert)
  - Anpassen des pH auf 7,0 mit NaOH

### 3.1.11 Puffer

#### *Alkali-Puffer*

50 mM NaOH  
 1 mM EDTA

#### *Coomassie Färbelösung*

30 % Methanol bzw. Ethanol  
 10 % Essigsäure  
 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R 250

#### *Denaturierender Spaltungspuffer*

20 mM Natriumcitrat, pH = 5,0  
 1 mM EDTA  
 7 M Harnstoff

#### *Denaturierungspuffer (Proteinreinigung)*

10 mM Tris-HCl, pH = 8,0  
 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 10 mM reduzierendes Glutathion  
 6 M Guanidinium Hydrochlorid

#### *Dialysepuffer*

10 mM NaAc, pH = 5,0

#### *Dialyseschlauch-Reinigungspuffer*

5 % (w/v)  $\text{NaHCO}_3$   
 50 mM EDTA

#### *DNA-Probenpuffer (6x)*

0,25 % Bromphenolblau  
 0,25 % Xylencyanol  
 50 % Glycerin  
 20 % TAE

#### *DNase I Puffer (10x)*

40 mM Tris-HCl, pH=8,0  
 10 mM  $\text{MgSO}_4$   
 1 mM  $\text{CaCl}_2$

**Elutionspuffer (Proteinreinigung)**

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM Tris-HCl, pH = 5,8  
500 mM Imidazol

**Entfärbelösung**

5,0 % Methanol/ Ethanol  
7,5 % Eisessig

**HBS-P Puffer**

0,01 M HEPES, pH = 7,4  
0,15 M NaCl  
0,005% (v/v) Surfactant P20

**Laemli-Probenpuffer (2x)**

125 mM Tris-HCl, pH 6.8  
20 % (v/v) Glycerin  
4 % (w/v) SDS  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

**Lysis-Puffer**

1 % (v/v) Triton-X-100  
10 mM EDTA  
0,8 M NaCl  
0,002% (w/v) Lysozym  
mit TBS auffüllen

**nativer Spaltungspuffer (10x)**

100 mM Tris-HCl, pH = 7,0  
1 M KCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>

**Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0**

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Phosphate buffered saline (PBS)**

140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH = 7,4

**PBST**

PBS-Puffer  
0,5 % Tween 20

**Probenpuffer Harnstoffgel**

2 x TBE  
16 M Harnstoff  
0,04 % Bromphenolblau  
0,04 % Xylencyanol

**Restriktionspuffer NEB2 (10x)**

100 mM Tris-HCl, pH 7.9  
500 mM NaCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT

**Restriktionspuffer NEB3 (10x)**

500 mM Tris-HCl, pH 7.9  
1 M NaCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT

**Restriktionspuffer NEB4 (10x)**

200 mM Tris-Acetat, pH 7.9  
500 mM Kaliumacetat  
100 mM Magnesiumacetat  
10 mM DTT

**RNA Elutionslösung**

7 M Harnstoff

**RNA-Probenpuffer (denaturierend):**

80 % Formamid  
0,05 % Bromphenolblau  
0,05 % Xylencyanol  
in 1 x TBE-Puffer

**RT-Puffer (5x):**

250 mM Tris-Acetat, pH = 8,4  
375 mM KCl  
40 mM Magnesiumacetat

**SI Nuclease Puffer (5x)**

200 mM NaAc, pH = 4,5  
1,5 M NaCl  
10 mM ZnSO<sub>4</sub>

**Sammelgelpuffer**

1 M Tris-HCl, pH = 6,8

**SDS-Proteingel-Laufpuffer (5x)**

192 mM Tris-HCl  
1,9 M Glycin  
0,5 % SDS

**Selektionspuffer 1 (1x) SELEX 1:**

20 mM HEPES, pH = 7,4  
150 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,01% (w/v) BSA

**Selektionspuffer 2 (1x) SELEX 2:**

20 mM HEPES, pH = 7,4  
150 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,01% (w/v) BSA

**Selektionspuffer 3 (1x) SELEX 3:**

20 mM HEPES, pH = 7,4  
150 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,01% (w/v) BSA

**Selektionspuffer 4 (1x) SELEX 4:**

20 mM HEPES, pH = 7,4  
150 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>

**T4-DNA Ligase-Puffer (10x)**

660 mM Tris-HCl, pH 7,5  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT  
10 mM ATP

**T4-RNA Ligase-Puffer (10x)**

500 mM Tris-HCl, pH = 7,8  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
10 mM ATP

**T4-Polynukleotidkinase-Puffer (10x)**

700 mM Tris-HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT

**T7-Transkriptionspuffer (5x):**

250 mM NaCl  
200 mM Tris-HCl, pH = 8,0  
40 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Spermidine

**Taq-DNA-Polymerase-Puffer:**

10 mM KCl  
10 mM Ammoniumsulfat  
20 mM Tris-HCl, pH=8,8  
2 mM Magnesiumsulfat  
0,1% Triton-X-100

**TAE-Puffer (10x)**

400 mM Tris-Acetat, pH = 8,0  
10 mM EDTA

**TBE (5x):**

445 mM Tris-HCl, pH = 8,0  
445 mM Borsäure  
10 mM EDTA

**TE-Puffer:**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
1 mM EDTA

**Trenngelpuffer**

1 M Tris-HCl, pH = 8,8

**Tris buffered saline (TBS)**

25 mM Tris-HCl, pH = 7,4  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl

**Waschpuffer 1 (Proteinreinigung)**

10 mM Tris-HCl, pH = 8,0  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**Waschpuffer 2 (Proteinreinigung)**

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM Tris-HCl, pH = 8,0  
50 mM Imidazol

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Nucleinsäure-Reinigung

#### 3.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Lösungen. Sie wird insbesondere zur Aufreinigung von Nucleinsäuren nach enzymatischen Reaktionen genutzt. Während Proteine im Lösungsmittelgemisch denaturieren und in der Interphase vorliegen, verbleiben Nucleinsäuren in die wässrige, obere Phase, die leicht abgetrennt werden kann.

Die Nucleinsäureprobe wurde mit dem äquivalenten Volumen eines Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol-Gemischs (25 : 24 : 1) versetzt, das mit 50 mM Natriumacetat (pH = 4,5) im Fall der Reinigungen von RNA oder mit 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0) bei DNA-Aufarbeitungen gepuffert war. Nach einminütiger Durchmischung auf dem Vortexer-Gerät wurden die Phasen durch eine Zentrifugation von 2 min bei 13.000 rpm in die untere Phenolphase, die proteinhaltige Interphase und eine wässrige, obere Phase getrennt. Die organische Phase wurde noch zwei weitere Male mit dem halben äquivalenten Volumen ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) eine Minute intensiv gemischt und erneut zentrifugiert. Mitgetragenes Phenol verblieb dabei in der organischen Phase. Die in der wässrigen Phase erhaltenen Nucleinsäuren präzipitierten unter Einwirkung von Ethanol, wodurch zugleich Chloroform-Reste entfernt werden konnten.

#### 3.2.1.2 Ethanol-Präzipitation

Durch die Fällung mit Ethanol werden Nucleinsäuren aufkonzentriert und gleichzeitig von unerwünschten Pufferkomponenten sowie Phenol oder Chloroform-Resten befreit. Die Gegenwart organischer Solventien führt zu einer Verringerung der Dielektrizitätskonstanten. Die Folge ist - nach dem Coulombschen Gesetz - eine Vergrößerung der elektrostatischen Anziehung zwischen entgegengesetzten Ladungen, womit eine Abnahme der Löslichkeit der Nucleinsäure einhergeht. Als Gegenion für die negativ geladenen Nucleinsäuren dient Natrium.

Die Nucleinsäurelösung wurde mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH = 4,8) und 2,5 bis 3 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol versetzt. Die Zugabe von 1 µl Glycogen (20 mg/ml), das mitgefällt wird, konnte die Ausbeute bei geringen Nucleinsäurekonzentrationen erhöhen. Der Ansatz wurde mind. 2 h oder üN bei -20 °C inkubiert. Anschließend konnten die Nucleinsäuren abzentrifugiert (20 min, 13.000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen werden. Das Pellet wurde bei 40 °C getrocknet oder 1-2 min lyophilisiert (nicht bis zur Trockne, da dies die Löslichkeit herabsetzt) und anschließend in Wasser (aus Reinstwasseranlage Milli-Q) resuspendiert.

Wird die Fällung mit Isopropanol durchgeführt, werden nur 0,7 Volumenanteile Alkohol benötigt. Der Vorteil ist ein kleineres Endvolumen; der Nachteil eine geringere Ausbeute. Die Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen.

### 3.2.1.3 Gelfiltration

Zum Wechseln des Puffers bzw. zum Entsalzen von Nucleinsäurelösungen sowie zur Abtrennung von kleinen Oligonucleotiden kamen in Abhängigkeit vom Probenvolumen NICK™, NAP™-5, NAP™-10 und NAP™-25 Säulen auf Sephadex-Basis von Amersham zum Einsatz. Man macht sich dabei das unterschiedliche Permeationsverhalten der Moleküle in die Poren des Gelbetts zunutze. Die großen Moleküle können im Gegensatz zu den kleinen nicht in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden deshalb sofort eluiert. Das Einhalten der Volumina bei der Beladung sowie der Elution ist deshalb extrem wichtig.

#### **Protokoll NICK™:**

- Waschen der Säule mit 3 ml Wasser
- Auftragen von max. 0,1 ml Probe
- Ad 0,4 ml mit Wasser
- Mit 0,4 ml Wasser eluieren

#### **Protokoll NAP™-5:**

- Waschen der Säule mit 10 ml Wasser
- Auftragen von max. 0,5 ml Probe
- Mit 1 ml Wasser eluieren

#### **Protokoll NAP™-10:**

- Waschen der Säule mit 15 ml Wasser
- Auftragen von max. 1 ml Probe
- Mit 1,5 ml Wasser eluieren

#### **Protokoll NAP™-25:**

- Waschen der Säule mit 25 ml Wasser
- Auftragen von max. 2,5 ml Probe
- Mit 3,5 ml Wasser eluieren

### 3.2.1.4 Spin-Filtration

Um die DNA-Bibliothek und PCR-Produkte nach der Selektion zu reinigen und zu konzentrieren, konnten Spin-Säulen unterschiedlicher Größe verwendet werden. Eine hydrophile Cellulosemembran mit bestimmter Ausschlußgrenze (MWCO) hält die gewünschten Oligonucleotide zurück, während kleinere Fragmente, Primer, Nucleotide oder Salze durchgelassen werden. Die gereinigten Produkte können mit Wasser eluiert werden, indem die Säulen umgedreht zentrifugiert werden.

Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion der PCR-Ansätze wurde die wässrige Phase je nach Volumengröße in eine *Centricon* YM-50 (MWCO 50.000) bzw. in eine *Microcon* YM-30 (MWCO 30.000) gefüllt und bei 14.000 x g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran noch zweimal mit je 500 µl Wasser gewaschen und wie oben zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution, indem zweimal je 50 µl Wasser auf die Membran pipettiert, 1 min inkubiert und die Säulen umgedreht bei 1000 x g 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Es empfahl sich weiterhin eine Ethanol-fällung, um letzte Phenolreste zu entfernen.

### 3.2.1.5 Gelelution

Obwohl die Gelelektrophorese in erster Linie ein analytisches Nachweisverfahren darstellt (siehe 3.2.2), besteht die Möglichkeit einer präparativen Anwendung zur effizienten Aufreinigung von RNA, PCR-Produkten oder der gezielten Isolation eines DNA bzw. RNA-Fragments. Eine Reinigung kann sowohl aus einem Agarose- als auch aus einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) erfolgen.

#### **Reinigung aus Agarosegelen:**

Die im (vorzugsweise *Biozym DNA Low Melt*) Agarosegel getrennten DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter längerwelligem UV-Licht (302 nm) mit einem sauberen Skalpell zügig ausgeschnitten, um Schädigungen, wie Thymin-Dimere, zu vermeiden. Die weiteren Schritte sind dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit von Qiagen entnommen, der auf der selektiven Bindung von DNA an eine Glasfaser-Matrix in Gegenwart von Hochsalzbedingungen basiert. Zu je 100 mg Gelstück wurden 100 µl chaotrophaltiger Puffer (siehe QIAquick<sup>®</sup>-Gel-Extraction-Kit-Anleitung) gegeben (max. 400 µl) und die Agarose unter leichtem Schütteln im Thermomixer bei 50 °C gelöst. Nach etwa 10 min wurde ein äquivalentes Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt und die Probe konnte auf die GFX-Säule aufgetragen werden. Einer kurzen Abzentrifugation (1 min, 16.000 x g) von denaturierten Proteinen und Salzen folgte der Waschschrift mit 750 µl Waschpuffer (TE-Puffer mit 80 %-igem Ethanol) und eine erneute Zentrifugation (1 min, 16.000 x g). Die Probe wurde mit max. 50 µl Wasser eine Minute inkubiert und durch 1-minütige Zentrifugation eluiert.

#### **Reinigung aus denaturierenden PAA-Gelen:**

Die durch *UV-Shadowing* (siehe 3.2.3.2) bzw. Autoradiographie (siehe 3.2.3.3) detektierten Gelbanden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte dann die Überschichtung der Gelstücke mit Wasser, so dass sie vollkommen bedeckt waren und in der Lösung schwimmen konnten (etwa 500 µl). Eluiert wurde dreimal in einem Schüttler (1000 rpm) 2 h bei 58 °C. Die Eluate konnten schließlich vereinigt und gegebenenfalls eingengt werden. Durch Gelfiltration und anschließende Ethanolfällung wurden die Nucleinsäuren von Harnstoff und Salzen befreit und aufkonzentriert.

### 3.2.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist die klassische Methode zur Analyse bzw. Reinigung von Nucleinsäuren. Das Trennprinzip der Gelelektrophorese beruht auf einer unterschiedlichen molekularen Beweglichkeit im elektrischen Feld, die von der Nettoladung, der Größe und der Struktur der Moleküle abhängt. Darüber hinaus beeinflussen die elektrische Feldstärke und die Porengröße der Gelmatrix die elektrophoretische Mobilität. Als Gelmatrix werden bei Agarosegelen linear veresterte D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-L-Galaktoseeinheiten, bei PAA-Gelen polymere Acrylamidstränge, die durch N,N'-Methylen-bisacrylamid vernetzt sind, verwendet. Die Porengröße der Gele läßt sich über die Konzentration des Gelbildners und die eingesetzte Menge an Vernetzer so einstellen, dass sie

dem jeweiligen Trennproblem angepasst werden kann. Die Nucleinsäuren liegen als Polyanion vor und wandern im elektrischen Feld je nach ihrer Größe und Struktur (bei nativen Gelen) zur positiv geladenen Anode. PAA-Gele werden bei Molekülgrößen bis 500 Basen, Agarosegele bei Molekülgrößen von 150-20.000 Basenpaaren verwendet.

### 3.2.2.1 Agarosegele

Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von Plasmid-DNA, Restriktionsspaltungen, PCR-Produkten bzw. zur Isolierung von DNA-Fragmenten unter nativen Bedingungen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele von 1-2 % zur Auftrennung von Molekülen zwischen 100 und 3000 bp benutzt. Über den Standard einer Basenpaar-Leiter ist eine Größenordnung möglich.

Standardmäßig wurde die Agarose in 60 ml (für eine kleine Kammer: 6,5 x 10 x 1 cm) bzw. 140 ml (für eine große Kammer: 15 x 10 x 1 cm) in TAE-Puffer unter leichtem Schwenken aufgeköcht (Tab. 3-1). Die abgekühlte schlierenfreie Lösung wurde mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, in der sie innerhalb von 20 min erstarrte. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer im molaren Verhältnis 1 : 1 versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese in TAE-Puffer dauerte bei einer konstanter Spannung von 110 V, was einer elektrischen Feldstärke von 8 bis 15 V/cm entspricht, etwa 1 h. Die Agarosegele konnten direkt unter UV-Licht analysiert werden. Erfahrungsgemäß sind 0,5 µg Plasmid sehr gut zu erkennen.

**Tabelle 3-1: Pipettierschema für Agarosegele**

	Agarosegehalt					
	1 %		1,5 %		2 %	
1x TAE	60 ml	140 ml	60 ml	140 ml	60 ml	140 ml
Agarose	0,6 g	1,4 g	0,9 g	2,1 g	1,2 g	2,8 g

### 3.2.2.2 Denaturierende Harnstoff-PAGE

Die Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eignet sich hervorragend für die Auftrennung von kleinen Oligonucleotiden (20-300 nt). Polyacrylamidgele zeichnen sich durch eine höhere Beladungskapazität und bessere Trennleistungen als Agarosegele aus. Das Trägermaterial ist aus Acrylamidketten aufgebaut, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt sind. Die Polymerisation wird durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat in zwei freie Sulfatradikale, die durch TEMED stabilisiert werden, initiiert. Die Porosität des Gels wird durch die Kettenlänge und den Grad der Quervernetzung bestimmt, die über die Konzentrationen und das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid eingestellt werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Trennung von einzelsträngigen Nucleinsäuren wurden denaturierende Bedingungen gewählt, um die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, die zu unterschiedlichem Laufverhalten im Gel führen können, zu unterbinden. Die Denaturierung der DNA bzw. RNA erfolgte deshalb mittels 7 M

Harnstoff, der die Ausbildung struktureller Wasserstoffbrückenbindungen stört. Standardmäßig wurden 10 %-ige PAA-Gele gefahren. Die Glasplatten (16 x 24 cm bzw. 19 x 24 cm) wurden mit einer 2 %-igen Dichlordimethylsilanlösung behandelt (siehe 3.2.2.4), um ein gutes Loslösen der Gele zu gewährleisten. Nach einer gründlichen Reinigung der Glasplatten konnten die Spacer (1 mm dick) passgerecht zwischen die Platten ineinander geschoben und mit Klammern befestigt werden, so dass ein Auslaufen der Lösung verhindert wurde. Die Gellösung wurde nach Tabelle 3-2 pipettiert, gut gemischt, zwischen die Platten eingefüllt und ein Taschenkamm fixiert. Nach einer halbstündigen Polymerisation wurden die Klammern, der Kamm sowie der untere Spacer entfernt und das Gel in der Gelkammer mit 1 x TBE als Laufpuffer überschichtet. Während der Probenvorbereitung konnte das Gel bei 35 mA und 600 V mind. 20 min vorlaufen, um eine gleich bleibende Temperatur im Gel zu erreichen. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, für 4 min bei 95 °C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Vor der Probenauftragung musste der Harnstoff aus den Taschen gespült werden. Für die erforderliche Bandenschärfe sollte das Endvolumen 20 µl nicht übersteigen. Die Elektrophorese fand bei 1100 V statt. Mit dem Auslaufen des Bromphenolblau-Farbmarkers nach etwa 1 h wurde die Trennung beendet und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

**Tabelle 3-2: Pipettierschema für 10 %-iges Harnstoff-PAA-Gel**

Komponente	C <sub>end</sub>	V
Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	10 %	25 ml
Harnstoff	7 M	42 g
5 x TBE	1 x	10 ml
10 % APS	0,06 %	0,6 ml
TEMED	0,06 %	60 µl
		ad 100 ml

### 3.2.2.3 Gele für die Spaltungsanalyse

Zur Analyse enzymatischer RNA-Spaltungen wurden hochauflösende 20 %-ige Polyacrylamidgele (0,4 mm Dicke) gegossen. Verwendet wurden Glasplatten der Größen (4 mm x 40 cm x 33 cm) und (4 mm x 42 cm x 33 cm), die auch mit 2 %-iger Dichlormethylsilanlösung behandelt wurden (siehe 3.2.2.4). Die Polymerisation der Gellösung konnte durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet werden. Nach etwa 1 h wurden die Gele in eine spezielle Kammer eingespannt (in 1 x TBE-Puffer) und bei 1250 V für mind. 1 h einer Präelektrophorese unterzogen. Die Elektrophorese fand bei 2000 V statt. Nach Beendigung des Laufs nach ungefähr 2-3 h wurde eine Glasplatte entfernt und das Gel mit Klarsichtfolie bedeckt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms konnte dann von dem Gel ein Autoradiogramm erstellt werden.

### 3.2.2.4 Silikonisierung

Damit sich die Gele leicht von den Glasplatten lösen, wurden diese vorbehandelt, um eine hydrophobe Oberfläche zu gewährleisten. Dazu wurden die Platten gründlich mit Wasser und Ethanol gereinigt

und 2 %-iges Dichlormethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan mit einem fusselfreien Papiertuch (Kimwipe) verteilt. Nach 30 min erfolgte die Wiederholung der Prozedur und nach weiteren 30 min konnten die Platten mit Ethanol poliert werden.

### **3.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Diese Methode wurde entwickelt, um Proteine aufgrund ihrer jeweiligen Molekulargewichte zu trennen. Bei einer SDS-PAGE wandern in einem elektrischen Feld geladene Moleküle, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von drei Faktoren abhängt: der Größe, der Form und der elektrischen Ladung der Moleküle. Die Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften, behandelt, so dass oligomere Proteine denaturieren und in ihre Untereinheiten zerlegt werden. SDS lagert sich an lipophile Bereiche der Untereinheiten. Dabei entsteht eine globuläre Struktur mit einer stark negativen Überschussladung. Unabhängig von der ursprünglichen Nettoladung gelingt so eine Auftrennung der Proteine in einem elektrischen Feld nur aufgrund der Größe des globulären Protein/SDS-Komplexes. Zur Spaltung der Disulfidbrücken-Bindungen wird der Proteinlösung eine Thiolverbindung wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Für eine gute Auftrennung ist neben der Wahl einer geeigneten Porengröße der richtige pH-Wert als auch die Ionenstärke im Gel- und Laufpuffer von entscheidender Bedeutung.

Bei der hier eingesetzten Gelelektrophorese (diskontinuierlichen pH-Elektrophorese) werden zwei Polyacrylamid-Gelschichten, das Sammelgel und das Trenngel, übereinander gegossen. Das Sammelgel ist die Gelschicht, durch die aufgetragene Proteine zuerst wandern und auf schmale Banden fokussiert werden. Das großporige Sammelgel enthält den Sammelgelpuffer mit einem pH-Wert von 6,8, der um zwei pH-Einheiten niedriger liegt als bei dem Trenngelpuffer und dem Laufpuffer. Wird ein Strom eingeschaltet, wandern die Puffer-Ionen wie  $\text{Cl}^-$  sehr schnell durch das Gel, während das sich im Laufpuffer befindliche Glycin bei  $\text{pH} = 6,8$  im isoelektrischen Punkt befindet, also neutral ist. Glycin kommt elektrophoretisch gesehen zum Stillstand und erzeugt einen Ladungsmangel zu Beginn des Sammelgels, d.h. es herrscht ein hoher elektrischer Widerstand in diesem Gelabschnitt. Nach dem Ohmschen Gesetz kommt es hier bei konstantem Strom zu einem lokalen Anstieg der Spannung. Die makromolekularen Anionen wandern so schneller durch diesen Gelabschnitt, bis sie die vorausgehenden Ionen im unteren Bereich des Sammelgels eingeholt haben und abgebremst werden. Im unteren Bereich sind wieder genügend Ladungsträger vorhanden und die lokale Spannung sinkt. Die Proteine wandern so entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit auf das Trenngel zu und werden an der Grenze gesammelt. Treten sie in das Trenngel ein, werden sie durch die kleineren Poren verlangsamt. Bei einem pH-Wert von 8,8 liegt Glycin negativ geladen vor und wandert schnell durch das Gel hindurch. Die Proteine können nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Fokussierung der Proteine beim Eintritt in das Trenngel erhöht die Auflösung dieser Methode beträchtlich (Voet, 1994). Mit Hilfe von aufgetragenen Markerproteinen lassen sich

die Molekulargewichte von den aufgetrennten Proteinen ermitteln. Für diese Arbeit wurden 12 und 15 %-ige Gele verwendet (Tab. 3-3).

Die für das Gelgießen verwendeten Glasplatten (10 x 10 cm<sup>2</sup>) wurden gründlich mit Wasser und anschließend mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Die Gellösung für das Trenngel wurde nach Tabelle 3-4 hergestellt und zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegeben. Zur gleichmäßigen Polymerisation des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach ungefähr 20 min wurde das Isopropanol von dem auspolymerisierten Gel entfernt und direkt über das Trenngel das Sammelgel gegossen, in das der Kamm für die Taschen zur Probenauftragung eingesetzt wurde. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Glasplatten mit dem Gel in die Laufapparatur eingespannt und dann die Anoden- und die Kathodenkammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, kurz vor der Auftragung nochmals aufgeköcht und dann in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Es wurden maximal 20 µl pro Tasche aufgetragen. Als Größenmarker wurde der LMW-Marker (*Low Molecular Weight Marker* von *Amersham*) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 80 V gestartet und sobald die Lauffront in das Trenngel einwanderte, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Auftrennung erfolgte je nach dem gewählten Vernetzungsgrad in 1-2 h, wobei die Lauffront anhand des Farbstoffes im Probenpuffer gut mitverfolgt werden konnte. Die Proteinbanden wurden anschließend in einer Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemacht. Der Färbung von 30 min folgte die Entfärbung in 20 % Ethanol und 7,5 % Essigsäure. Die Nachweisgrenze beträgt etwa 0,1 µg Protein.

**Tabelle 3-3: Pipettierschema für die SDS-PAGE**

Gelkomponente	Sammelgel 4 %	Trenngel	
		12 %	15 %
H <sub>2</sub> O bidest	4,5 ml	2,9 ml	2,1 ml
Sammelgelpuffer 1 M	0,75 ml	-	-
Trenngelpuffer 1 M	-	3,76 ml	3,76 ml
SDS 10 %	0,06 ml	0,1 ml	0,1 ml
Acrylamid-Lösung (19:1)	0,63 ml	3,2 ml	4,0 ml
APS (10 %ig)			
Ammoniumperoxodisulfat in Wasser	0,04 ml	0,025 ml	0,025 ml
TEMED			
Tetramethylethylendiamin	0,012 ml	0,012 ml	0,012 ml
	6 ml	10 ml	10 ml

### 3.2.3 Nachweismethoden für Nucleinsäuren in Gelen

#### 3.2.3.1 Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid ist ein heterozyklischer, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der in die Nucleinsäuren interkaliert wird. Polyacrylamidgele wurden für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in Wasser) angefärbt und danach kurz in Wasser gewaschen. Bei Agarosegelen

wurde das Ethidiumbromid bereits zu der noch flüssigen Agarosegellösung zugesetzt. Auf einem Transilluminator konnten bei 306 nm die Nucleinsäuren als leuchtende Banden sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurde das Programm QuantityOne von *BioRad* verwendet.

### 3.2.3.2 UV-Shadowing

Bei der präparativen Aufreinigung von Nucleinsäuren sollte die Interkalation von Farbstoffen vermieden werden, weshalb hierbei die Methode des *UV-Shadowing* verwendet wurde. Der Nachweis der Nucleinsäuren mit *UV-Shadowing* beruht auf der Absorption der Basen bei 260 nm. Dazu wurde ein PAA-Gel in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (60 F254) behandelt wurde. Aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) ließ den Fluoreszenzfarbstoff aufleuchten, nur die Stellen, an denen die Nucleinsäuren das Licht absorbierten, waren als dunklen Schatten zu erkennen. Sie wurden mit einem Stift markiert und anschließend ausgeschnitten. Um eine Schädigung der Nucleinsäuren durch das UV-Licht zu vermeiden, sollte dieser Schritt möglichst schnell durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Empfindlichkeit (bis ungefähr 200 pmol).

### 3.2.3.3 Autoradiographie

<sup>32</sup>P-radioaktiv markierte Nucleinsäuren können in Gelen, je nach ihrer spezifischen Aktivität, sehr sensitiv durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms nachgewiesen werden (< fmol). PAA-Gele mit <sup>32</sup>P-markierten Oligonucleotiden wurden nach Abnehmen einer Glasplatte mit Klarsichtfolie bedeckt und mit drei phosphoreszierenden Punkten markiert. In einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie konnten zwei Röntgenfilme auf das Gel gelegt werden. Bei präparativen Gelen diente ein Film als Schablone, der andere zur Dokumentation. Je nach Menge und spezifischer Aktivität der Nucleinsäure wurde der Film für 10 min bis 48 h exponiert. Bei längeren Expositionszeiten musste die Kassette bei -80 °C eingefroren werden, um eine Diffusion der Oligonucleotide zu verhindern. Die exponierten Filme wurden entwickelt (1-2 min, Röntgenentwickler G150), fixiert (1 min, Röntgenfixierer G350), gewaschen und getrocknet. Bei präparativen Gelen wurde die schwarze Bande eines Röntgenfilms ausgeschnitten und die schwarzen Punkte der Marker mit den Fluoreszenzpunkten auf dem Gel in Übereinstimmung gebracht. Der Film konnte so als Schablone verwendet werden und die Nucleinsäure aus dem Gel ausgeschnitten werden. Anschließend erfolgte die Elution aus dem Gel (siehe 3.2.1.5).

### 3.2.3.4 Messung der Radioaktivität

Die radioaktive Markierung von Nucleinsäuren ist eine praktische Methode, um kleinste Mengen (< fmol) detektieren zu können. Die Quantifizierung erfolgte bei <sup>32</sup>P-Markierung durch Cerenkov-Zählung. Dazu wurde die mit <sup>32</sup>P-markierte zu vermessende Probe in einem Glas-Szintillationsröhrchen im Szintillationszähler (LS 6000 SC, Beckman) mit einem speziellen Programm

( $^{32}\text{P}$ , Cerenkov-Zählung) eine Minute vermessen. Die  $^3\text{H}$  markierten Proben mussten in ein Plastik-Szintillationsröhrchen umgefüllt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit 20 min inkubiert und mit dem Programm für Tritium im Zähler vermessen werden. Die Messung wurde in der Zählrate cpm (*counts per minute*) angegeben, da von der Zerfallsrate dpm (*deposits per minute*) eines Präparates nur ein Teil vom Detektor registriert werden kann. Die Zählrate hängt mit der Zerfallsrate über die Zählausbeute ZA zusammen:

$$\text{cpm} = \text{ZA} \cdot \text{dpm} \quad (3-1)$$

Da die Zählausbeute bei allen vermessenen Proben die gleiche ist, können Berechnungen mit den Werten in cpm durchgeführt werden.

### 3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

#### 3.2.4.1 Optische Dichte

UV-Licht führt zur Anregung konjugierter  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen und bewirkt den Elektronenübergang in das nicht besetzte  $\pi^*$ -Orbital. Nucleinsäuren besitzen bei Wellenlängen um 260 nm ein Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer wässrigen Nucleinsäurelösung wurde in Quarzküvetten ein Spektrum der optischen Dichte zwischen 220 und 320 nm aufgenommen. Der Wert der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) dient als Grundlage für die Abschätzung der Konzentration unter der Voraussetzung einer Schichtdicke von 1 cm (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  (Quotient Q) lässt auf die Reinheit der Nucleinsäurelösung schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

#### Umrechnungsfaktoren:

- 1  $A_{260}$  doppelsträngige DNA  $\cong$  50  $\mu\text{g/ml}$
- 1  $A_{260}$  einzelsträngige DNA  $\cong$  33  $\mu\text{g/ml}$
- 1  $A_{260}$  RNA  $\cong$  40  $\mu\text{g/ml}$

#### 3.2.4.2 Lambert-Beersches Gesetz

Die Intensität der Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3-2)$$

Extinktion E und Konzentration c sind in verdünnten Lösungen (mit  $c < 0,01$  mol/l) und für Extinktionswerte zwischen 0,1 und 0,8 linear proportional. Der spezifische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist eine bei der Wellenlänge  $\lambda$  charakteristische Stoffkonstante. Ist  $\varepsilon$  bekannt, kann mit dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration des Stoffes in Lösung berechnet werden. Der Faktor d entspricht der Schichtdicke der Küvette.

## 3.2.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.5.1 DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. DNA-Polymerasen benötigen einen Primer mit einer freien 3'-OH-Gruppe, da sie nicht in der Lage sind, DNA-Ketten *de novo* zu synthetisieren. Als ein Grund wird die obligatorische Überprüfung des vorhergehenden Basenpaares durch die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität angesehen. Zwei Primersequenzen werden so gewählt, dass sie komplementär zu den jeweiligen 3'-Enden des kodogenen und nicht-kodogenen Matrizenstranges sind. Durch Hybridisierung der Primer an die hitzedenaturierten Matrizenstränge werden folglich das terminale 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definiert. Die Primer werden matrizenabhängig von einer thermostabilen DNA-Polymerase in 5' → 3'-Richtung verlängert. Im Ergebnis sind aus einer dsDNA-Matrize zwei dsDNA-Fragmente entstanden, die nun wiederum selbst als Matrizen fungieren. Die mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus, bestehend aus den drei Temperaturschritten Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, führt zur exponentiellen Anreicherung der DNA. Durch Verwendung von überhängenden Primern kann eine Verlängerung der DNA-Matrize erreicht werden. Auf diese Weise wurde der T7-Promotor, der für die *in vitro* Transkription essentiell ist, nach jeder Runde neu eingeführt.

In Abhängigkeit von der zu amplifizierenden Menge und des Einsatzes der PCR an unterschiedlichen Stellen des SELEX-Prozesses wurden verschiedene Ansätze pipettiert (Tab. 3-4 bis 3-8). Alle Ansätze wurden mit einer modifizierten *Taq* DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) ohne N-Terminus und ohne 5' → 3'-Exonukleaseaktivität durchgeführt. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität, aber auch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate aus, die während des SELEX-Prozesses wünschenswert ist. Die PCR-Produkte wurden mittels PAA-Gelelektrophorese überprüft. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte wie oben beschrieben oder mittels des *Macherey und Nagel NucleoSpin Extract II Kit* (siehe Angaben des Herstellers).

### 3.2.5.2 Präparative PCR

Nach der Amplifikation der synthetisierten einzelsträngigen DNA-Bibliothek sollten mind. 1,6 nmol (entspricht  $10^{15}$  verschiedene Teilchen) doppelsträngige DNA erhalten werden, um eine ausreichende Vielfalt in dem Ausgangspool zur Verfügung zu stellen. In dieser Arbeit wurden 3 - 8 nmol ssDNA umgesetzt. Es wurde zuerst eine optimale Amplifikationsrate bei möglichst wenigen Zyklen bestimmt, um eine große Vielfalt an DNA-Molekülen in der Bibliothek zu erhalten. Bei niedriger Zyklenzahl werden gut amplifizierbare Sequenzen nicht bevorzugt vermehrt. Bei diesem Schritt sollten lediglich eine große Menge an einzelsträngigen DNA-Molekülen in Doppelstrang-DNA einschließlich des T7-Promotors umgewandelt werden. Bei den Bibliotheken 1 und 4 wurde eine 6-fache Amplifikationsrate

nach 10 Zyklen erzielt, bei der Bibliothek 2 nach 15 Zyklen und bei der Bibliothek 3 nach 14 Zyklen (für die Sequenzen der Bibliotheken siehe Anhang 9.1).

**Tabelle 3-4: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die PCR der Bibliothek 1**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [µl]	T [°C]	t [min]	Zyklen
DNA Matrize		10 pmol	x	94	4,5	
Forward-Primer	100 µM	5 µM	5	94	1	
Reverse-Primer	100 µM	5 µM	5	59	1	10x
PCR-Puffer (NEB)	10x	1x	10	72	1	
dNTPs	10 mM	0,2 mM	2	74	5	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,5 mM	4	4	∞	
Taq-Polymerase	5U/µl	5U	1			

ad 100 µl

**Tabelle 3-7: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die PCR der Bibliothek 2**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [µl]	T [°C]	t [min]	Zyklen
DNA Matrize		20 pmol	x	95	2	
Forward-Primer	100 µM	4 µM	4	95	0,5	
Reverse-Primer	100 µM	4 µM	4	56	1,5	15x
PCR-Puffer (NEB)	10x	1x	10	72	1,5	
dNTPs	10 mM	0,2 mM	2	74	3	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,5 mM	2	4	∞	
Taq-Polymerase	5U/µl	2,5U	0,5			

ad 100 µl

**Tabelle 3-5: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die PCR der Bibliothek 3**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [µl]	T [°C]	t [min]	Zyklen
DNA Matrize		10 pmol	x	94	4	
Forward-Primer	100 µM	4 µM	4	94	1	
Reverse-Primer	100 µM	4 µM	4	63	1	14x
PCR-Puffer (NEB)	10x	1x	10	74	0,5	
dNTPs	10 mM	0,2 mM	2	74	3	
Taq-Polymerase	5U/µl	5U	1	4	∞	

ad 100 µl

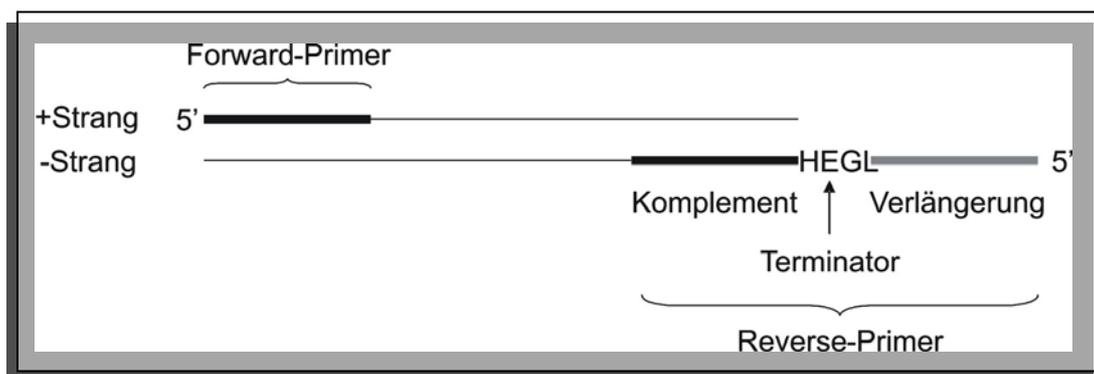
**Tabelle 3-6: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die PCR der Bibliothek 4**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [µl]	T [°C]	t [min]	Zyklen
DNA Matrize		7 pmol	x	93	3	
Forward-Primer	100 µM	3 µM	3	93	1	
Reverse-Primer	100 µM	3 µM	3	63	1	10x
PCR-Puffer (NEB)	10x	1x	10	72	1	
dNTPs	10 mM	0,2 mM	2	74	3	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5,5 mM	22	4	∞	
Taq-Polymerase	5U/µl	2,5U	0,5			

ad 100 µl

### 3.2.5.3 PCR zur Erzeugung der ssDNA-Bibliothek 2

Um für die DNA-Bibliothek 2 aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt einzelsträngige DNA-Moleküle zu isolieren, wurde ein spezieller Reverse-Primer verwendet, der am 5'-Ende nach der komplementären Sequenz einen Hexaethylglycolrest (HEGL) als Terminator und einen Poly-dA<sub>20</sub>-Rest als Verlängerung aufweist (Williams & Bartel, 1995; siehe Abbildung 3-1). Wegen des Terminators kann der + Strang nicht weiter durch die DNA-Polymerase verlängert werden, während der – Strang durch den Poly-dA<sub>20</sub>-Rest um 20 Nucleotide verlängert ist. Die zwei unterschiedlich langen DNA-Stränge konnten über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennt und der gewünschte + Strang konnte ausgeschnitten werden. Die Reinigung erfolgte wie unter 3.2.1.5 beschrieben. Im Anschluss an die PCR wurden eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Reinigung mit den *Centricon* Spin-Säulen durchgeführt (siehe 3.2.1.4). Nach der Ethanolfällung konnte die Konzentration bestimmt und die doppelsträngige DNA als Matrize für die *in vitro* T7-Transkription eingesetzt werden.



**Abbildung 3-1: Prinzip der PCR zur Erzeugung der ssDNA-Bibliothek:** Die Elongation des + Strangs durch die DNA-Polymerase ist durch die Einführung eines Terminators im -Strang unterbrochen, während der – Strang durch die Verlängerung des Reverse-Primers um 20 Nucleotide größer ist als der + Strang. Die unterschiedlich langen Stränge können über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennt werden.

### 3.2.5.4 PCR nach reverser Transkription

Der Ansatz der reversen Transkription wurde ohne Zwischenreinigung auf zwei 100 µl PCR-Ansätze verteilt. Die Zeiten der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurden herabgesetzt und die Zyklenzahl verlängert (Tab. 3-8). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion, *Microcon* Spin-Säulen und Ethanolfällung.

**Tabelle 3-8: Pipettierschema und Temperaturprogramm für die PCR nach der reversen Transkription**

<b>Komponente</b>	<b>C<sub>Stamm</sub></b>		<b>C<sub>end</sub></b>				<b>V [µl]</b>
RT-Ansatz							10
Forward-Primer	100 µM		1 µM				1
Reverse-Primer	100 µM		1 µM				1
PCR-Puffer (NEB)	10x		1x				10
dNTPs	10 mM		0,2 mM				2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	Pool 1 0,5mM	Pool 2 0,5mM	Pool 3 -	Pool 4 5,5mM	x	
Taq-Polymerase	5U/µl		2,5U				0,5

ad 100 µl

<b>T [°C]</b>				<b>t [min]</b>	<b>Zyklen</b>
94				3	
94				0,5	
Pool 1 59	Pool 2 56	Pool 3 63	Pool 4 63	0,5	30x
74				0,5	
74				3	
4				∞	

### 3.2.5.5 PCR zur Amplifikation klonierter Sequenzen

Die analytische Kolonie-PCR stellt ein hervorragendes Werkzeug dar, um mit geringem Aufwand eine Vielzahl von Klonen auf ein inseriertes Fragment zu testen, und wurde nach der Klonierung des angereicherten Pools verwendet. Die Methode umgeht das Animpfen einer Flüssigkultur und die Plasmidisolierung. Stattdessen hybridisieren die beiden Primer der Bibliothek an den Vektor. Das determinierte intermediäre DNA-Fragment wird in der PCR amplifiziert. Die Analyse im Agarosegel zeigt im positiven Fall eine Bandenverschiebung, die der inserierten Fragmentgröße entspricht.

Die Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze von der LB-Agarplatte gepickt und in 20 µl Wasser suspendiert. Die Zellen konnten bei 95 °C für 5 min aufgeschlossen werden und anschließend erfolgte die Abzentrifugation der Zelltrümmer für 2 min bei 13.000 x g. Von dem Überstand wurde 1 µl in der PCR als Matrize eingesetzt. Eine PCR wurde auch mit isolierten Plasmiden durchgeführt, um Matrizen für Bindungsassays zu erhalten, wobei die inserierte Sequenz aus dem vollständigen Vektor herausamplifiziert und mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II Kits* (siehe Angaben des Herstellers) aufgereinigt wurde. Das Pipettierschema und das Temperaturprogramm erfolgten wie bei der PCR nach der reversen Transkription (siehe 3.2.5.4).

### 3.2.5.6 PCR zur Verkürzung des Aptamers S3-20

Von dem Aptamer S3-20 wurden zwei Verkürzungsvarianten V1 (61 mer) und V2 (53 mer) mittels PCR hergestellt. Hierbei wurden zwei Paar neue Reverse- und Forward-Primer konstruiert, die auch mit V1 und V2 bezeichnet wurden (siehe Anhang 9.1: Reverse- und Forward-Primer V1 bzw. V2 zur



**Tabelle 3-9: Pipettierschem für die T7-Transkription**

Komponente	C <sub>Stamm</sub>	C <sub>end</sub>	V [ $\mu$ l]
DNA-Matrize		10 $\mu$ g	
DTT	750 mM	30 mM	8
rNTPs	25 mM	2 mM	16
RNase Inhibitor	40U/ $\mu$ l	40U	2
Puffer (Stratagene)	5x	1x	40
BSA	0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l	12 $\mu$ g	48
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	8 mM	16
T7-RNA-Polymerase	50U/ $\mu$ l	150 U	3
$\alpha^{32}$ P-CTP	10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	10 $\mu$ Ci	1

ad 200  $\mu$ l

Nach der Transkription wurde das DNA-Matrize unter Einwirkung von RQ1 DNase I (1 U/ $\mu$ l) in einer Endkonzentration von 1 Unit je Mikrogramm DNA bei 37 °C degradiert. Der Verdau wurde nach 30 min mit Probenpuffer gestoppt und der Transkriptionsansatz auf ein 10 % PAA-Gel aufgetragen. Das Produkt konnte im Gel entweder durch *UV-Shadowing* oder Autoradiographie detektiert werden. Die Aufreinigung des Transkript erfolgte durch Gelelution, Gelfiltration und Ethanol-Fällung. Die Konzentration wurde über die optische Dichte bei 260 nm erfasst. Größe und Reinheit der RNA waren in der Gelelektrophorese ersichtlich.

### 3.2.5.8 Reverse Transkription

Nach jeder Selektionsrunde wurde die selektierte RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, um mittels PCR amplifiziert zu werden. Reverse Transkriptasen stammen aus Retroviren wie *avian myeloblastosis virus* (AMV) oder *moloney murine leukemia virus* (MMLV), die das Enzym benutzen, um DNA-Kopien ihres RNA-Genoms herzustellen. Verwendet wurden für die Bibliotheken 1 und 4 die *ThermoScript™ RNase H-Reverse Transcriptase* von *Invitrogen*, die ursprünglich aus AMV isoliert und dahingehend genetisch verändert wurde, dass sie eine reduzierte RNase H Aktivität und eine höhere thermale Stabilität besitzt. Bei dem SELEX-Verfahren werden besonders RNA-Moleküle generiert, die eine stabile intramolekulare Struktur ausbilden, da diese Moleküle hohe Bindungsfähigkeiten aufweisen. Durch erhöhte Temperaturen werden ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA aufgeschmolzen. Erst dadurch sind diese RNA-Moleküle für die reverse Transkription zugänglich und werden für die folgenden Selektionsrunden bewahrt. Für die Bibliothek 3 wurde die *PowerScript™ Reverse Transcriptase* von *BD Biosciences* eingesetzt, die eine veränderte MMLV reverse Transkriptase ist. Die RNase H Aktivität ist hier komplett ausgeschaltet und erlaubt so eine größere Ausbeute an cDNA. Ähnlich wie bei der PCR wurde ein zum 3'-Ende komplementärer Primer (Reverse-Primer) benötigt, um ein DNA-RNA-Hybrid zu bilden, das anschließend von der reversen Transkriptase verlängert werden konnte. Da sich das Hybrid teilweise schwer bildet, wurde vor der eigentlichen Reaktion ein Hybridisierungsschritt eingeführt, in dem die RNA und der Primer bei 70 °C bzw. bei 65 °C 10 min inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt wurden. Durch Zugabe von DMSO kann die Hybridisierung noch verbessert werden. Der

Transkriptionsansatz (Tab. 3-10 und 3-11) wurde zu dem Hybridisierungsansatz pipettiert und schließlich bei 42 °C (für die *PowerScript*<sup>TM</sup> *Reverse Transcriptase*) bzw. 55 °C (für die *ThermoScript*<sup>TM</sup> *RNase H-Reverse Transcriptase*) für 1 h inkubiert.

**Tabelle 3-10: Pipettierschema für die reverse Transkription mittels *PowerScript*<sup>TM</sup> *Reverse Transcriptase***

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>End</sub>	V [ $\mu$ l]	
RNA			8	70 °C, 10 min
Reverse-Primer	15 $\mu$ M	30 pmol	2	
DMSO		5%	1	
RT-Puffer	5x	1x	4	
DTT	0,1M	5 mM	2	
dNTPs	10mM	1 mM	2	
PowerScript	15U/ $\mu$ l	15U	1	
			20	

**Tabelle 3-11: Pipettierschema für die reverse Transkription mittels *ThermoScript*<sup>TM</sup> *RNase H-Reverse Transcriptase***

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>End</sub>	V [ $\mu$ l]	
RNA			8	65°C, 5 min
Reverse-Primer	15 $\mu$ M	30 pmol	2	
RT-Puffer	5x	1x	4	
DTT	0,1M	5 mM	2	
dNTPs	10mM	1 mM	2	
RNase Out	40U/ $\mu$ l	40U	1	
Thermoskript	15U/ $\mu$ l	15U	1	
			20	

### 3.2.5.9 Klonierung

Um das Gemisch der unterschiedlichen Sequenzen in der angereicherten Bibliothek analysieren zu können, wurden die Sequenzen durch molekulare Klonierung in Bakterienzellen separiert. Für die molekulare Klonierung der angereicherten Bibliothek wurde das pGEM<sup>®</sup>-T System von *Promega* verwendet werden. Der Vektor wurde mit der Restriktionsendonuclease *EcoR V* geschnitten und an die freien 3'-Enden wurde je ein Thymidin angehängt. Einige DNA-Polymerasen, darunter die hier verwendete *Taq* DNA-Polymerase, besitzen eine Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die einen 3'-Überhang eines einzelnen Desoxyadenylats verursacht. Die Klonierungsstrategie basiert auf der Ligation der 3'-Thymidin Überhänge des Vektors an der Insertionsstelle mit den Adenosinanhängen der PCR-Produkte.

### 3.2.5.10 DNA-Ligation

Bei der Ligation wurden die PCR-Produkte jeweils zwischen die überhängenden Desoxythymidylate an den 3'-Enden des pGEM<sup>®</sup>-T Vektors inseriert, in deren Ergebnis ein rezirkularisiertes Plasmid

entstand. Die Knüpfung der Phosphodiesterbindung durch die T4-DNA-Ligase unter Verbrauch von ATP entspricht der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche. Das molare Verhältnis von Vektor : Fragment entsprach 1 : 5. Ligierte wurde bei 4°C üN.

**Tabelle 3-12: Pipettierschema für die DNA-Ligation**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [µl]
Plasmid		50 ng	A
Insert		10 ng	B
T4-Ligase-Puffer	2 x	1 x	5
T4-DNA-Ligase	1 U/µl	1 U	1
			ad 10 µl

### 3.2.5.11 Transformation kompetenter Zellen

Kompetenz von Zellen bezeichnet die Fähigkeit, fremde DNA in die Zelle aufzunehmen. Im Gegensatz zur Konjugation (direkter Kontakt F<sup>+</sup>-Zelle → F<sup>-</sup>-Zelle) oder zur Transduktion (via Bakteriophagen) wird bei der Transformation freie, lösliche DNA in ein Empfängerbakterium übertragen. Infolge der variablen Zelloberfläche während des Wachstums, kann DNA nur innerhalb einer kurzen Zeitspanne in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase adsorbiert werden. Durch Behandlung mit Calciumchlorid oder durch Elektroporation können gezielt kompetente Zellen hergestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* JM109 kompetente Zellen von *Promega* verwendet, um die PCR-Produkte der SELEX zu klonieren, sowie *E. coli* BL21(DE 3) und *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL kompetente Zellen von *Stratagene* für die Klonierung des zellulären Prionproteins. Der Ligationsansatz von 2 µl bzw. isolierter Vektor wurden zu einem Aliquot von 50 µl kompetenter Zellen in einem Reaktionsgefäß gegeben, leicht gemischt und zur Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche für 20 min auf Eis gestellt. Eine 10 minütige Inkubation der Zellen mit 1 µl β-Mercaptoethanol vor der Zugabe der Fremd-DNA kann die Aufnahmefähigkeit der Zellen erhöhen. Während des Hitzeschocks von 42 °C für 45 s im Wasserbad erfolgte die Aufnahme der DNA in die Zellen. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 950 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen zwecks Expression der Ampicillinresistenz für 1,5 h bei 37 °C inkubiert (150 rpm). Abschließend konnten 100-200 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert werden. Dazu wurde ein Drigalski-Spatel in 70 % Ethanol getaucht, abgeflammt und unter leichtem Drehen der LB-Agarplatte die Zellsuspension gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank (max. 16 h zur Verhinderung von Satellitenkolonien). Die Transformationseffizienz der JM109-Zellen belief sich auf etwa 10<sup>7</sup> bis 10<sup>8</sup> Transformanden pro Mikrogramm Plasmid-DNA.

### 3.2.5.12 Selektion der positiven Klone

Nur ein kleiner Teil der Bakterien nimmt ein Plasmid auf, das wiederum nur zu einem geringen Prozentsatz das gewünschte Fragment enthält. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, durch geeignete genetische Systeme die positiven Klone zu selektieren. Ampicillinhaltige LB-Agarplatten ermöglichen ausschließlich transformierten Bakterien, die eine plasmid-kodierte Ampicillinresistenz erworben haben, ein Wachstum. Über ein Blau-/Weiß-Screening, das die Umsetzung von X-Gal in einen blauen Farbstoff beinhaltet, gelingt die Unterscheidung zwischen Religanden und rekombinanten Klonen nach folgendem Prinzip: Die verwendeten Bakterienstämme tragen auf dem F'-Episom die genetischen Marker *lacZ*ΔM15 und *lacI*<sup>q</sup>, die eine partielle Deletion des β-D-Galactosidase-Gens und eine Überproduktion des Lac-Repressors bewirken. Auf dem Plasmid liegt das *lacZ'*-Gen, das das fehlende α-Peptid der β-Galactosidase inklusive der *multiple cloning site* enthält. Handelt es sich um ein religiertes Plasmid ohne Insert, wird die β-Galactosidase durch das plasmid-kodierte α-Peptid komplementiert, so dass nach IPTG-Induktion das exprimierte Enzym X-Gal spalten kann (α-Komplementation). Die Religanden erscheinen blau, während positive Klone weiß bleiben.

Vor dem Ausplattieren der Zellsuspension wurden 100 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid, im Dunkeln zu lagern) und 100 µl einer 100 mM IPTG-Lösung auf der Agarplatte verteilt und auf 37 °C im Brutschrank erwärmt.

### 3.2.5.13 Plasmid-Präparation

Für die DNA-Sequenzierung und zur Kontrolle der *in vitro* Rekombination musste das Plasmid aus der Zelle isoliert werden. Verwendung fand der kommerzielle NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey und Nagel, dessen Vorteil eine direkte Säulenelution des Plasmids ohne Ethanol-Fällung ist. Maximal 2 ml Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (11.000 x g, 30 s) und in 250 µl Resuspensionspuffer homogenisiert. Nach Zugabe von 250 µl Lyse-Puffer (SDS / Alkalisch) wurden die Zellen 5 min aufgeschlossen. Wichtig hierbei ist eine sanfte Durchmischung, da sonst die chromosomale DNA durch mechanische Scherwirkung freigesetzt wird. Neutralisationslösung (300 µl) und eine 10-minütige Zentrifugation (11.000 x g) präzipitierten Proteine und die denaturierte chromosomale DNA. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Silicamembran pipettiert, an die das Plasmid während einer 1-minütigen Zentrifugation adsorbierte. Das Plasmid wurde mit 500 µl 50 °C warmen speziellen Waschlösungspuffer und anschließend mit 600 µl 80 % Ethanol enthaltenen Waschlösungspuffer versetzt und für 1 min zentrifugiert (11.000 x g). Um alle Ethanolreste zu entfernen, erfolgte nochmals eine Zentrifugation für 2 min bei 11.000 x g. Schließlich konnte das Plasmid mit 30 µl Wasser für 1 min bei 11.000 x g durch Zentrifugation eluiert werden.

### 3.2.5.14 DNA-Sequenzierung

Die Desoxy-Methode nach Sanger basiert auf der kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Replikation durch 2',3'-Didesoxyanaloga, deren Einbau das weitere Kettenwachstum blockiert

(Sanger *et al.*, 1977). Die Reaktion wird in vier parallelen Ansätzen durchgeführt, die jeweils in der Farbe der kovalenten Fluoreszenzmarkierung am Primer sowie dem 2',3'-Dideoxynalogon variieren. Nach der Hybridisierung an das DNA-Matrize wird der Sequenzierprimer durch eine DNA-Polymerase verlängert. Unter statistisch optimierten Bedingungen, die im Wesentlichen einen Unterschub des 2',3'-Dideoxynalogons gegenüber den 2'-Monodesoxy-NTPs beinhalten, kommt es für die jeweilige Base an jeder ihrer Positionen im DNA-Matrize zum Kettenabbruch. Im Ergebnis entstehen Fragmente verschiedener Länge mit einem Dideoxynalogon am 3'-Ende. Die vier Reaktionsgemische werden vereinigt und im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand der Fluoreszenz werden die Banden am Ende des Gels detektiert und einer Base zugeordnet. Die Farbsequenz korrespondiert direkt mit der Basensequenz des Komplementärstrangs in 5' → 3'-Richtung. Für die Sequenzierreaktionen wurden jeweils 0,6 µg Plasmid-DNA und 20 pmol pUC Primer benötigt. Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma *Sequence Laboratories Göttingen GmbH*.

### 3.2.5.15 Markierung von Oligoribonucleotiden

#### 3'-Markierung

Die T4-RNA-Ligase katalysiert unter ATP-Hydrolyse die Veresterung von Ribonucleinsäuren, die 5'-Monophosphat- und freie 3'-Hydroxylgruppen tragen. Auf diese Weise konnte die radioaktive 3'-Markierung der freien 3'-Hydroxylgruppe der RNA mit der 5'-Monophosphatgruppe eines Cytidin-3'-[5'-<sup>32</sup>P]-diphosphats (pCp) erfolgen. Der Ligationsansatz wurde pipettiert und für mindestens 18 h bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des RNA-Probenpuffers gestoppt und die markierte RNA über ein denaturierendes PAA-Gel gereinigt.

**Tabelle 3-13: Pipettierschema für die 3'-Markierung**

Komponente	C <sub>Stamm</sub>	C <sub>End</sub>	V [µl]
RNA		20 pmol	x
RNA-Ligase-Puffer	10 x	1 x	2
T4-RNA-Ligase	20 U/µl	20 U	1
α- <sup>32</sup> P-pCp	10 µCi/µl	10 µCi	1
			ad 20 µl

#### 5'-Markierung

Mit Hilfe des Enzyms T4-Polynucleotidkinase lassen sich Oligonucleotide am freien 5'-Ende phosphorylieren. Dabei wird der radioaktive Phosphatrest des [γ-<sup>32</sup>P]-ATPs auf die RNA übertragen. Als Matrize wurde die 5' dephosphorylierte RNA aus dem Desphosphorylierungsansatz verwendet. Die Inkubation des Kinasierungsansatzes erfolgte für 1,5 h bei 37 °C. Mit RNA-Probenpuffer konnte die Reaktion gestoppt und über ein denaturierendes PAA-Gel gereinigt werden.

**Tabelle 3-14: Pipettierschema für die 5'-Markierung**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [ $\mu$ l]
dephosphorylierte RNA		20 pmol	x
Kinase-Puffer	10 x	1 x	2
T4-Polynucleotidkinase	10 U/ $\mu$ l	20 U	1
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP	10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	10 $\mu$ Ci	1
			ad 20 $\mu$ l

### 3.2.5.16 Dephosphorylierung

Da T7-Transkriptionsprodukte phosphorylierte 5'-Enden aufweisen, mussten diese mit Hilfe der alkalischen Phosphatase für 1 h bei 37 °C hydrolysiert werden. Der Ansatz wurde mit Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt und aufkonzentriert.

**Tabelle 3-15: Pipettierschema für die Dephosphorylierung**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [ $\mu$ l]
RNA		20 pmol	x
NEB3-Puffer	10 x	1 x	1
alk. Phosphatase (CIP)	10 U/ $\mu$ l	20 U	0,5
			ad 10 $\mu$ l

### 3.2.5.17 Nucleolytische Spaltungen von Ribonucleinsäuren

Ribonucleasen hydrolysieren RNA-Moleküle an bevorzugten, exponierten Stellen in der Primär- bzw. Sekundärstruktur. Die Analyse des Spaltungsmusters einer limitierten Spaltung mit bestimmten RNasen erlaubt daher eine Aussage über die Sekundärstruktur des zu untersuchenden RNA-Moleküls (Knapp, 1989). Die Enzymkonzentration und die Inkubationsdauer müssen dabei so gewählt werden, dass kein vollständiger Verdau der radioaktiv markierten RNA auftritt. Ungefähr 50 % der eingesetzten RNA sollten nicht hydrolysiert werden, damit statistisch nur eine Spaltung pro Molekül erfolgt. Durch die Zugabe von kalter Hefe-RNA werden dem Enzym weitere spaltbare Edukte geliefert und die Reaktionsbedingungen können noch sensitiver eingestellt werden.

Vor der Spaltung unter nativen Bedingungen wurde die RNA im Bindungspuffer bei 75 °C denaturiert, innerhalb einer halben Stunde abgekühlt und dabei hybridisiert. Dieser Schritt unterstützte die native Faltung des Aptamers, mit der auch die Bindungsstudien durchgeführt wurden. Nach der Hybridisierung wurden die entsprechenden RNase-Verdaureaktionen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Mit Hilfe der Ribonuclease T1 erfolgte außerdem die Hydrolyse unter denaturierenden Bedingungen, um einen internen Marker zu erhalten. Anhand der bekannten Sequenz und der Alkalileiter konnten die Reaktionsprodukte der nativen Spaltungen nach der Auftrennung auf einem PAA-Gel zugeordnet werden. Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l in silikonisierten Reaktionsgefäßen durchgeführt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10  $\mu$ l RNA-Probenpuffer beendet.

### 3.2.5.18 Spaltung mit Ribonuclease T1 (RNase T1)

Ribonuclease T1 (aus *Aspergillus oryzae*) ist eine Endoribonuclease, die spezifisch einzelsträngige RNA an Guanosinnucleotiden spaltet. Die Phosphodiesterbindung wird zwischen dem 3'-Guanosinrest und dem 5'-OH des angrenzenden Nucleotids (...Gp↓N...) hydrolysiert unter Bildung eines 2', 3'-zyklischen Phosphats als Übergangszustand. Als Reaktionsprodukt entstehen Oligonucleotide mit einem terminalen 3'-GMP. Die RNase T1 ist auch in der Lage unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) zu arbeiten und wird deshalb zum Erstellen eines internen Markers verwendet. Der Ansatz unter denaturierenden Bedingungen ohne Enzym wurde zuerst für 5 min auf 50 °C erhitzt und dann nach Zugabe des Enzyms wie der native Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

**Tabelle 3-16: Pipettierschema für die Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		20.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
RNase T1	1 U/μl	0,1 U/μl	1
Denat. Spaltungspuffer	1x	1x	ad 10 μl

**Tabelle 3-17: Pipettierschema für die Spaltung mit RNase T1 unter nativen Bedingungen**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		20.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
RNase T1	0,1 U/μl	0,01 U/μl	1
Spaltungspuffer	10x	1x	1
			ad 10 μl

### 3.2.5.19 Spaltung mit Ribonuclease A (RNase A)

Ribonuclease A (*bovine pancreas*) ist eine Endoribonuclease, die spezifisch einzelsträngige RNA bei C und U Resten hydrolysiert. Zwischen der 5'-Ribose eines Nucleotids und der benachbarten Phosphatgruppe einer 3'-Pyrimidinribose wird die Phosphodiester Bindung gespalten (...Yp↓N...).

**Tabelle 3-18: Pipettierschema für die Spaltung mit RNase A**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		20.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
RNase A	0,1 U/μl	0,005 U/μl	0,5
Spaltungspuffer	10x	1x	1
			ad 10 μl

### 3.2.5.20 Spaltung mit Nuclease S1

Die Nuclease S1 (*aspergillus oryzae*) spaltet sequenzspezifisch einzelsträngige RNA- und DNA-Moleküle unter Freisetzung von Nucleosid- oder Oligonucleotid-5'-phosphaten. Dieses

Zn<sup>2+</sup>-abhängige Glycoprotein wurde unter nativen Bedingungen verwendet, um einzelsträngige Regionen in Aptameren zu charakterisieren.

**Tabelle 3-19: Pipettierschema für die Spaltung mit Nuclease S1**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		20.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
Nuclease S1	10 U/μl	0,8 U/μl	0,8
Nuclease S1-Spaltungspuffer	5x	1x	2
			ad 10 μl

### 3.2.5.21 Spaltung mit Ribonuclease V1 (RNase V1)

Mit der Ribonuclease V1 (*cobra venom*) lassen sich bevorzugt doppelsträngige RNA-Regionen charakterisieren. Als Spaltprodukte entstehen Oligonukleotid-5'-phosphate (pN...).

**Tabelle 3-20: Pipettierschema für die Spaltung mit RNase V1**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		20.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
RNase V1	0,01 U/μl	0,5·10 <sup>-3</sup> U/μl	0,5
Spaltungspuffer	10x	1x	1
			ad 10 μl

### 3.2.5.22 Partielle alkalische Hydrolyse von Ribonucleinsäuren

Im Gegensatz zu den stabileren Desoxyribonucleinsäuren lassen sich Ribonucleinsäuren unter alkalischen Bedingungen spalten. Über einen zyklischen 2', 3'-Phosphat-Übergangszustand entstehen Gemische aus 2'- und 3'- Nucleosidmonophosphaten.

Unter Verwendung der partiellen alkalischen Hydrolyse von 3'- oder 5'- radioaktiv markierten Oligoribonucleotiden konnten Spaltprodukte jeder möglichen Länge hergestellt werden, die als Alkalileiter fungierten. Der Ansatz wurde 2 min bei 95 °C verdaut und sofort danach auf Eis gestellt. Die Reaktion konnte anschließend durch Puffern mit RNA-Probenpuffer auf Eis gestoppt und auf das PAA-Gel aufgetragen werden.

**Tabelle 3-21: Pipettierschema für die alkalische Hydrolyse**

Komponente	c <sub>Stamm</sub>	c <sub>end</sub>	V [μl]
RNA		10.000 cpm	x
Hefe-RNA	10 μg/μl	5 μg	0,5
Alk. Hydrolyse Puffer	2x	1x	5
			ad 10 μl

## 3.2.6 Überexpression und Reinigung von PrP<sup>C</sup>

### 3.2.6.1 *In vivo* Überexpression

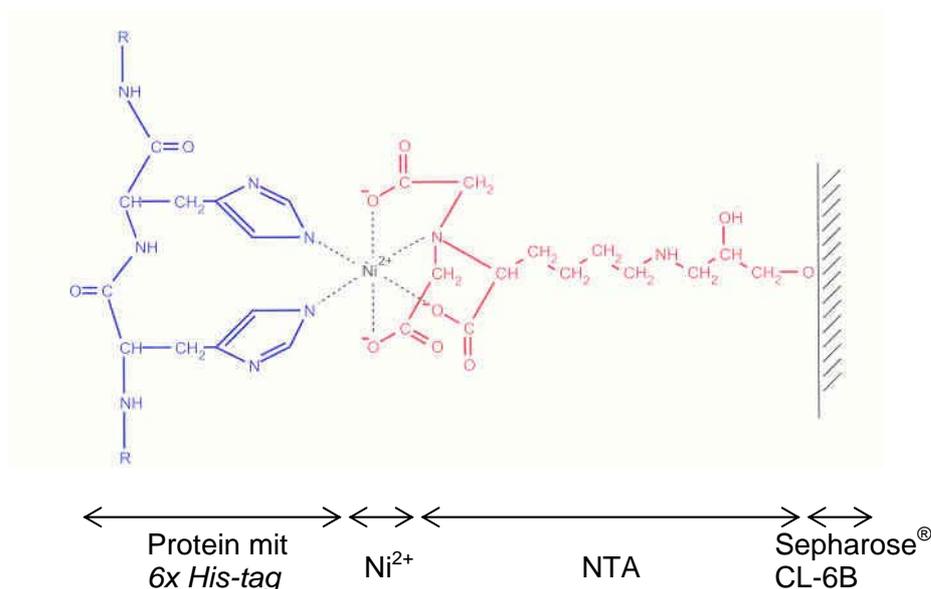
Zur Expression der zellulären Form des Prionproteins wurde der Vektor pET-15b mit dem genomischen Fragment Prnp90-231 aus *mesocricetus aureus* (Goldhamster) von Dr. Michael Baier vom Robert-Koch-Institut, Berlin, und der Vektor pRSET A mit dem genomischen Fragment Prnp23-231 aus *mesocricetus aureus* von Dr. Joachim Clos vom Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Bei dem Prionprotein (23-231) wurde zusätzlich eine Thrombin-Spaltungsstelle eingeführt, so dass der 6x His-tag abgespalten werden konnte. Beide Vektoren stehen unter der Kontrolle des T7-Promotors und enthalten einen kodierten 6x His-tag zur Aufreinigung über eine Ni-Affinitätschromatographie. Der pRSET A Vektor besitzt zusätzlich noch die Sequenz für eine Thrombin-Schnittstelle zwischen dem 6x His-tag und dem gewünschten Protein. Die Vektoren wurden in die Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) von *Stratagene* (für pET-15b) und *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL von *Stratagene* (für pRSET A) inkloniert. Bei beiden Stämmen wurden die Proteasen lon und ompT ausgeschaltet, so dass überexprimierte Proteine nicht abgebaut werden. Die Expression kann mit IPTG induziert werden; die Stämme weisen allerdings auch eine schwache basale nicht induzierte Expression auf.

Zuerst wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers 20 ml LB/Amp-Medium (Ampicillin 200 µg/ml) in einem Erlenmeyerkolben mit dem entsprechenden Klon angeimpft und bei 37 °C, 200 rpm ungefähr 6-8 h geschüttelt. Je 10 ml dieser Vorkultur konnten in 2 x 1 l LB/Amp-Medium in 3 l Kolben gegeben werden. Die Hauptkultur wurde üN bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte ein Austausch des Mediums, indem in einer Sorvall Zentrifuge (Rotor: GS-3) bei 4 °C und 5000 rpm für 15 min die Zellen abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit wenig LB/Amp-Medium resuspendiert, in 3 l Kolben überführt und die Zellsuspension auf je 1 l aufgefüllt. Die Kultur wurde für eine weitere Stunde bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt. Die Expression konnte durch Zugabe von 0,3 ml IPTG (Stammlösung 1M, c<sub>END</sub> 300 µM) pro 1 l Zellkultur induziert und für weitere 4-5 h bei 37 °C, 200 rpm fortgesetzt werden. Durch Bindung des Induktors IPTG (Isopropyl-1-thio-β-galactosid), ein Allolactose-Analogon, verändert der *lac*-Repressor seine Konformation, die seine Affinität zur Operator-DNA herabsetzt. Der beladene Repressor diffundiert vom *lac*-Operator ab und gibt damit den in unmittelbarer Nachbarschaft befindlichen T7-Promotor frei. Die Zellsuspension wurde danach bei 4 °C, 5000 rpm für 15 min mit der Sorvall (Rotor: GS-3) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets üN bei -70 °C eingefroren. Die Resuspension der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ultratorax in 100 ml Lyse-Puffer. Nach ungefähr einer halben Stunde rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension viskos und zeigte den Zellaufschluß an. Nach Zugabe von 8 ml MgCl<sub>2</sub> (Stammlösung: 0,5 M) und 20 µl Benzonase® wurde nochmals ungefähr 10 min gerührt bis die Suspension an Viskosität verlor. Es folgte eine Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor: GSA) bei 4 °C, 10.000 rpm für 30 min. Da

das Prionprotein in *inclusion bodies* in den Zellen gelagert wird, befindet es sich nach der Zentrifugation unlöslich im Pellet, das bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden kann.

### 3.2.6.2 Reinigung und Faltung von PrP<sup>C</sup>

Die Reinigung und Rückfaltung des Prionproteins wurde im Wesentlichen nach Zahn *et al.* (1997) ausgeführt. Die Reinigung basiert auf Nickel-Affinitätschromatographie. Das Nickelion ist über vier der vorhandenen sechs Koordinationsstellen mit der Agarose über einen Chelatkomplex mit NTA (*Nitrilotriaceticacid*) verbunden (Abb. 3-3). Der angehängte *6x His-tag* des Proteins kann über die freien Elektronenpaare des Stickstoffs mit den verbleibenden zwei Koordinationsstellen des Nickels wechselwirken. Während das gewünschte Protein über den *6x His-tag* hochaffin an die Matrix bindet, werden Verunreinigungen entfernt. Das gereinigte Protein kann dann durch einen Überschuss an Imidazol (Histidin-Analogon) durch Verdrängung eluiert werden.



**Abbildung 3-3: Wechselwirkungen zwischen benachbarten Resten des *6x His-tag* und der Ni-NTA-Agarose (nach *QIAexpressionist*<sup>TM</sup>, fifth edition, Qiagen).**

Die Pellets (siehe 3.2.6.1) wurden mittels Ultratorax in 100 ml Guanidinium-Hydrochlorid-enthaltenden Denaturierungspuffer resuspendiert und die Suspension mit der Sorvall zentrifugiert ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10.000 rpm, 30 min). Der Überstand enthielt das lösliche denaturierte Prionprotein, zu dem 30 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und für ungefähr eine halbe Stunde inkubiert wurde. Nach der Inkubation konnte die Suspension mit der Heraeus Labofuge 400 bei Raumtemperatur für 5 min und 2000 rpm pelletiert werden. Die Matrix wurde anschließend mit Waschpuffer 1 suspendiert, zentrifugiert und anschließend noch zweimal gewaschen. Das Säulenmaterial wurde in eine sterile leere Glassäule mit Fritte gegeben und nochmals mit ungefähr 100 ml Waschpuffer 1 gespült. Die Rückfaltung des Proteins in die native zelluläre Form fand auf der Säule statt. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde die Säule mit 400 ml Gradient (Denaturierungspuffer gegen Waschpuffer 1) gewaschen und Guanidinium Hydrochlorid langsam entfernt. Abschließend wurde mit

30 ml Waschpuffer 2 nachgewaschen, um jegliche Verunreinigung zu entfernen. Die Elution des gefalteten PrP<sup>C</sup> erfolgte mit ungefähr 15 ml Elutionspuffer. Die Fraktionen wurden in Reaktionsgefäßen à 1 ml gesammelt und der Proteingehalt mittels Protein-Assay nach Bradford bestimmt. Die Fraktionen mit dem größten Proteingehalt wurden vereinigt und  $\text{üN}$  gegen den Dialysepuffer dialysiert. Um den 6x His-tag abzuspalten, wurden 0,1 U Thrombin pro ml Proteinlösung eingesetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze p-Aminobenzamidinecelite und eine Inkubation für weitere 3 h. Die Lösung konnte 15 min bei Raumtemperatur und 3200 x g zentrifugiert werden, um das Enzym abzutrennen. Der Überstand wurde nochmals gegen den Dialysepuffer dialysiert und mittels *Centricon* Plus-20 aufkonzentriert. Die Analyse sämtlicher Schritte erfolgte über SDS-PAGE (siehe 3.2.2.5).

### 3.2.6.3 Dialyse

Mittels Dialyse durch eine semipermeable Membran können Proteine von kleinen Molekülen getrennt werden. Der Konzentrationsgradient zwischen der Proteinlösung und ihren Pufferkomponenten auf der inneren Membranseite sowie dem Dialysepuffer in der Umgebung treibt einen Diffusionsprozess an. Während kleine Moleküle die Membranporen passieren, werden Moleküle, deren Stokescher Radius größer als der Porendurchmesser ist, zurückgehalten. Nach einer hinreichend großen Zeit hat ein Konzentrationsausgleich stattgefunden. Aufgrund eines vergleichsweise großen Pufferreservoirs zum Probenvolumen entspricht die Endkonzentration annähernd der Eingangskonzentration des Pufferreservoirs.

Für die Dialyse fand der Dialyseschlauch von Spectrapor™ (MWCO 8000) Verwendung. Die vereinigten Proteinfractionen wurden in einen ungefähr 10 cm langen und 2,4 cm breiten Dialyseschlauch gefüllt, der an beiden Seiten mit Plastikklammern zu verschließen ist. Die Dialyse erfolgte in 2 l Dialysepuffer  $\text{üN}$  bei 4 °C. Nach der Dialyse wurde die Membran geöffnet und die dialysierte Proteinprobe per Pipette entnommen.

### 3.2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe des Bradford Proteinassays bestimmt. Diese Nachweismethode basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie® Brilliant Blue, wenn dieser Farbstoff zu der Proteinlösung gegeben wird. Der Farbstoff besitzt im kationischen, neutralen und anionischen Zustand verschiedenen Absorptionsmaxima. Im Bradford-Reagenz liegt der Farbstoff in der roten kationischen Form vor. Bindet er an Proteine, wird die blaue anionische Form stabilisiert, die bei 595 nm das Absorptionsmaximum zeigt. Der Farbstoff bindet in erster Linie an basische und aromatische Aminosäurereste (Bradford, 1976). Mit Hilfe einer BSA-Standardgerade kann die Proteinmenge berechnet werden.

Für die Standardreihe wurden 1-20 µg BSA zu 800 µl PBS und 200 µl Bradford Reagenz gegeben und im Photometer bei 595 nm vermessen. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinfractionen wurden

zu je 790  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer 10  $\mu\text{l}$  der Fraktionen und abschließend 200  $\mu\text{l}$  des Bradford Reagenz hinzugegeben. Die Messung der Proben erfolgte im Photometer bei 595 nm. Anschließend konnte die Konzentration berechnet werden.

Die Proteinkonzentration kann auch über das das Lambert-Beersche Gesetz bei bekanntem spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  bei 280 nm berechnet werden (siehe Gleichung 3-2). Die Extinktionskoeffizienten der denaturierenden Proteine bzw. Peptide können aus einer Datenbank (*Expasy*) abgelesen werden. Um die Extinktionskoeffizienten der nativen Proteine zu erhalten, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt. Die gleiche Konzentration eines Proteins wurde unter denaturierenden bzw. nativen Bedingungen im Photometer bei 280 nm vermessen. Der fehlende native Extinktionskoeffizient konnte aus den gemessenen Extinktionen berechnet werden.

**Tabelle 3-22: Übersicht über die Extinktionskoeffizienten und die Molmasse des Prionproteins**

Protein	$\epsilon_{280}$ (denat.) [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	$\epsilon_{280}$ (nativ) [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	M [g/mol]
PrP <sup>C</sup> (90-231)	24180	22854	16401
PrP <sup>C</sup> (23-231)	62005	61000	22973

### 3.2.7 Durchführung der *in vitro* Selektion (SELEX)

Die chemisch synthetisierte DNA (für die Sequenzen siehe Anhang 9.1) wurde mittels präparativer PCR (siehe 3.2.5.2) in doppelsträngige DNA amplifiziert und mittels T7-Transkription in RNA umgeschrieben (siehe 3.2.5.7). Für die erste Selektionsrunde wurden 3,2-10,0 nmol RNA eingesetzt, was theoretisch mind.  $2 \cdot 10^{15}$  Teilchen entspricht (Tab. 3-23).

**Tabelle 3-23: Überblick über eingesetzte Mengen RNA bzw. DNA bei den verschiedenen Schritten der SELEX Experimente.**

Bibliothek	Firma	Länge [nt] (Länge des randomisierten Bereichs [nt])	ssDNA für PCR	dsDNA für T7- Transkription	RNA- bzw. DNA-Ausbeute nach Reinigung	eingesetzte RNA bzw. DNA für die 1. Runde
RNA 1 (SELEX 1)	IBA	100 (60)	3,2 nmol	3,2 nmol	21,2 nmol	10 nmol
DNA 2 (SELEX 2)	IBA	88 (50)	8 nmol	-	10,3 nmol	3,2 nmol
RNA 3 (SELEX 3)	IBA	102 (60)	3,2 nmol	5 nmol	9,8 nmol	3,2 nmol
RNA 4 (SELEX 4)	TIB Molbiol	71 (40)	5 nmol	5 nmol	22,3 nmol	4 nmol

**Tabelle 3-24: Übersicht über die eingesetzten RNA- bzw. DNA-Mengen in den einzelnen Runden.**

Runde	SELEX 1: RNA 1 [nmol]	SELEX 2: DNA 2 [nmol]	SELEX 3: RNA 3 [nmol]	SELEX 4: RNA 4 [nmol]
1	10	3,2	3,2	4,0
2	2,5	2,0	2,0	1,5
3	2,0	1,5	1,0	1,25
4	1,5	1,5	0,5	1,0
5	1,5	0,75	0,25	1,0
6	1,5	0,75	0,25	1,0
7	1,5	0,75	0,25	1,0
8	1,5	0,5	0,25	1,0
9	1,0	0,5	0,25	1,0
10	1,0	0,5	0,25	1,0
11	1,0			1,0
12	1,0			1,0
13	1,0			1,0
14	1,0			
15	1,0			

Für die folgenden Runden wurde die verwendete Menge an RNA von 2,5 nmol auf 0,25 nmol reduziert (Tab. 3-24). Vor jeder Selektionsrunde erfolgte standardmäßig eine Selektion gegen die Matrix, um unspezifisch bindende Aptamere zu entfernen. Die kombinatorische Bibliothek wurde vor der Inkubation mit dem Zielmolekül im jeweiligen Bindungspuffer 2 min bei 75 °C denaturiert und innerhalb einer halben Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine native Faltung der Moleküle zu erreichen. Nach der Selektion und der Isolierung der gebundenen Oligonucleotidmoleküle erfolgte die reverse Transkription (siehe 3.2.5.8) und die Amplifikation mittels PCR (siehe 3.2.5.4). Der angereicherte Pool konnte in der nächsten Runde eingesetzt werden. Es wurden insgesamt vier verschiedene SELEX-Experimente durchgeführt (drei mit RNA-Bibliotheken (Bibliothek 1,2 und 3) und eine mit einer DNA-Bibliothek (Bibliothek 2), siehe Anhang 9.1), die sich hauptsächlich in der Durchführung des Selektionsassays unterschieden, der im Folgenden näher beschrieben werden soll.

### 3.2.7.1 SELEX 1 gegen PrP<sup>27-30</sup>, Gegenselektion gegen PrP<sup>C</sup> (Bibliothek 1)

Für alle Ansätze und Waschungen wurde der Selektionspuffer 1 (20 mM HEPES, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) BSA) verwendet. Vor der eigentlichen Selektion erfolgte mit der RNA-Bibliothek eine Gegenselektion gegen das zelluläre Prionprotein, um PrP<sup>C</sup>-Binder aus der Bibliothek zu entfernen. Dazu wurden 300 µg PrP<sup>C</sup> mit einem 6x His-tag an 50 µl Ni-NTA-Agarose in 1 ml Mobicol-Säulen immobilisiert und dreimal mit 500 µl Selektionspuffer 1 gewaschen. Der radioaktiv markierte gefaltete RNA-Pool wurde mit dem immobilisierten PrP<sup>C</sup> für 30 min geschüttelt bei einem molaren Verhältnis von RNA : Protein von 1 : 6. Die nicht gebundene RNA konnte durch Zentrifugation (13.000 rpm, 30 s) von der Säule gespült werden, die danach einmal mit 100 µl Selektionspuffer 1 gewaschen wurde. Die vereinigten RNA-Durchläufe wurden in für die Ultrazentrifuge geeignete Reaktionsgefäße gegeben und im Szintillationszähler vermessen. Die

Selektion gegen die Matrix erfolgte in der Ultrazentrifuge bei 125.000 x g für 1 h bei 4 °C. In dem abgenommenen Überstand der zentrifugierten RNA-Lösung sollten sich jetzt nur RNA-Moleküle befinden, die eine Affinität weder an PrP<sup>C</sup> noch an die Matrix aufweisen. Schließlich wurde der so reduzierte Pool mit dem eigentlichen Target PrP<sup>27-30</sup> für 1 h bei Raumtemperatur im Schüttler (300 rpm) inkubiert. Für die Selektion wurde ein molares Verhältnis von RNA : Protein von 5 : 1 gewählt. Das aus TSE-infizierten Hamsterhirnen isolierte PrP<sup>27-30</sup> lag in großen unlöslichen Klumpen vor, die vor der Selektion kurz mit Ultraschall (30 s) behandelt und mit der Pipette resuspendiert wurden. Zusätzlich wurde zu dem Ansatz RNase-Inhibitor ( $c_{\text{end}} = 2 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) gegeben, da bei der Isolierung der pathogenen Form des Prionproteins Verunreinigungen mit RNasen nicht auszuschließen waren. Um gebundene RNA von nicht gebundener RNA zu trennen, wurde der Ansatz bei 100.000 x g für 30 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge präzipitiert. Der RNA-Protein Komplex lag im Pellet vor, während sich im Überstand nur freie RNA Moleküle befanden. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  Selektionspuffer einmal gewaschen. Das Pellet wurde dann im Szintillationszähler vermessen und der RNA-Protein Komplex zweimal mit je 100  $\mu\text{l}$  Harnstofflösung (7 M) denaturiert und die RNA isoliert. Die vereinigten Eluate konnten mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol  $\text{üN}$  gefällt werden. Insgesamt wurden 15 Selektionsrunden durchgeführt.

### 3.2.7.2 SELEX 2 gegen PrP<sup>27-30</sup> (Bibliothek 2)

Diese Selektion wurde ausgenommen der folgenden Veränderungen genauso wie SELEX 1 durchgeführt: Die Gegenselektion gegen zelluläres PrP<sup>C</sup> wurde unterlassen, anstelle einer RNA- wurde eine DNA-Bibliothek verwendet und es wurde ein leicht veränderter Selektionspuffer (Selektionspuffer 2: 20 mM HEPES, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) BSA) eingesetzt. Es wurden insgesamt 10 Selektionszyklen durchgeführt.

### 3.2.7.3 SELEX 3 gegen Peptid 1 / Peptid 2 (Bibliothek 3)

Zur Immobilisierung der biotinylierten Peptide wurden mit Streptavidin (SA) beschichtete magnetische Partikel (MP) der Fa. *Roche* verwendet. Streptavidin ist über einen molekularen Linker mit den Carboxylgruppen der Oberfläche der superparamagnetischen Polystyrol Partikeln gekoppelt. Biotin besitzt eine hohe Affinität zu Streptavidin ( $K_D = 10^{-15} \text{ M}$ ) und eignet sich daher gut, um Moleküle auf den mit Streptavidin beschichteten Magnetpartikeln zu immobilisieren. 1 mg Magnetpartikel (10 mg/ml) können etwa 140 pmol Peptid binden. Für die Selektion wurden Peptidkonzentrationen eingesetzt, die sich im linearen Bereich und nicht in der Sättigung der Bindungskurve befanden. Es wurde der Selektionspuffer 3 (20 mM HEPES, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% (w/v) BSA) verwendet.

Für die Matrixselektion wurden 40  $\mu\text{l}$  Magnetpartikel in einem Reaktionsgefäß dreimal mit jeweils 1 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Trennung von Partikeln und Lösung erfolgte in einem magnetischen Separationsständer. Während die Partikel an der Gefäßwand haften blieben, konnte die

Lösung mit einer Pipette entfernt werden. Mit Biotin behandelte Magnetpartikel wurden mit 100 µl der gefalteten RNA-Lösung bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde im Schüttler (300 rpm) inkubiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und die Partikel noch einmal mit 100 µl Puffer gewaschen. Die Messung der Lösung erfolgte im Szintillationszähler. Zur gleichen Zeit wurden 80 µl Magnetpartikel nach dreimaligem Waschen mit 150 pmol Peptidlösung inkubiert. Nach der Kapazität der Partikel sollten ungefähr 110 pmol Peptid immobilisiert worden sein. Nach der Inkubation wurden die Magnetpartikel dreimal mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen und die RNA nach der Matrixselektion hinzugegeben (1 h, 300 rpm). Es wurde ein molares Verhältnis von RNA : Peptid von 2 : 1 gewählt. Nach der Bindung wurden die Magnetpartikel zwei weitere Male gewaschen (200 µl Bindungspuffer) und schließlich konnte die gebundene RNA von den Peptiden mit zweimal 100 µl 7 M Harnstoff bei 95 °C eluiert werden. Außerdem wurde mit den Magnetpartikeln nach der Elution eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, um eine hohe Elutionsrate zu erzielen. Die vereinigten Elutionslösungen wurden im Szintillationszähler vermessen und ebenfalls einer Phenol/Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-fällung unterzogen.

#### **3.2.7.4 SELEX 4 gegen *in vitro* aggregierte PrP-Oligomere O1 (Bibliothek 4)**

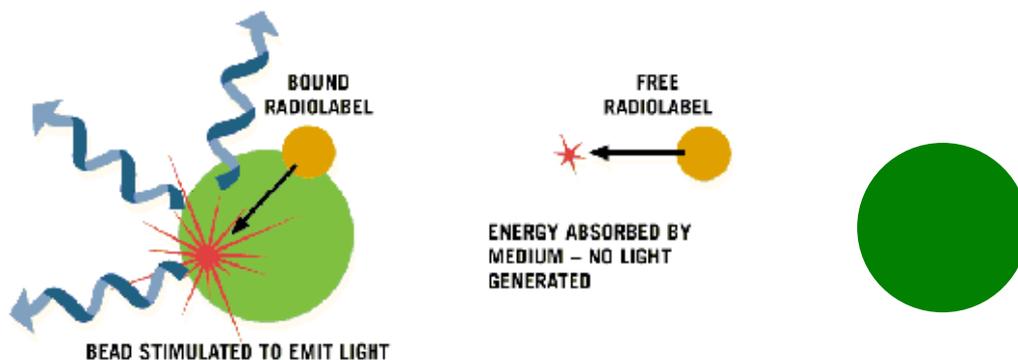
Zur Trennung der nicht gebundenen RNA und des RNA-Protein Komplexes wurden Nitrozellulosemembranen (MF HAWPO1300 von *Millipore*) mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die Membranen wurden mit Wasser befeuchtet und in spezielle, wieder verwendbare Filterhalter eingebaut. In die obere Öffnung konnte Flüssigkeit eingefüllt werden, an der unteren Öffnung wurde eine Spritze befestigt, mit der Unterdruck erzeugt wurde, so dass die Flüssigkeit durch den Filter gesaugt werden konnte. Proteine und RNA-Protein Komplexe blieben unspezifisch auf der Membran haften, während ungebundene RNA die Membran passierte.

Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal mit je 300 µl Wasser, dreimal mit je 300 µl Bindungspuffer 4 gewaschen und mit 100 µl der gefalteten RNA-Lösung kurz inkubiert. Die Membran wurde einmal mit 100 µl Bindungspuffer nachgewaschen und die vereinigten RNA-Lösungen konnten mit dem PrP-Oligomer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. In der ersten Runde wurde ein molares Verhältnis RNA : Oligomer von 5 : 1 eingesetzt, ab der 2. Runde wurde das molare Verhältnis auf 10 : 1 erhöht. Die Messung der Ansätze erfolgte im Szintillationszähler, bevor sie durch die Nitrozellulosemembran gesaugt wurden. Die sich auf der Membran befindlichen RNA-Protein Komplexe wurden anschließend 20-mal mit 300 µl Bindungspuffer gewaschen. Für die Elution wurde die Membran aus dem Filterhalter entfernt, in ein Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit 200 µl Harnstofflösung (7 M) bei 95 °C für 10 min kräftig geschüttelt. Die vereinigten Eluate konnten im Zähler vermessen und dann einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen werden.

### 3.2.8 Charakterisierung der selektierten RNA

#### 3.2.8.1 Scintillation Proximity Assay (SPA)

Die Klone der SELEX 3 gegen Peptid 1 konnten sehr schnell und effizient auf Binder und Nicht-Binder mit dem *Scintillation Proximity Assay* getestet werden. Der Assay basiert auf der gesteuerten Auslösung des Szintillationssignals ausschließlich durch ein radioaktives Molekül, das sich durch Bindung in unmittelbarer Umgebung eines Szintillationspartikels befindet. Wenn ein radioaktives Atom zerfällt, gibt es je nach Isotop sub-atomare Partikel wie Elektronen ( $\beta$ -Strahlung) und verschiedene Formen von Energien ab. Die Entfernung, die diese Partikel in Lösung zurücklegen können, ist, in Abhängigkeit von der Energie der Partikel, limitiert. Die SPA-Beads bestehen aus kleinen Fluomicrosphären, die einen Szintillant enthalten und mit einem Bindungspartner bedeckt sind. Wird nun mit radioaktiven Isotopen gearbeitet, die eine kurze  $\beta$ -Partikel Reichweite aufweisen, kann der Szintillant nur angeregt werden, wenn sich das Isotop in unmittelbarer Nähe des Szintillationspartikels befindet. Dieser Fall setzt eine Bindung eines radioaktiv-markierten Moleküls voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tritium [ $^3\text{H}$ ] als radioaktives Isotop verwendet, das eine Reichweite von 1,5  $\mu\text{m}$  besitzt, d.h. in einer wässrigen Lösung ist die Energie der abgegebenen  $\beta$ -Partikel nur in der Reichweite von 1,5  $\mu\text{m}$  ausreichend, um den Szintillant anzuregen Licht abzugeben. Abbildung 3-4 veranschaulicht das SPA-Prinzip.



**Abbildung 3-4: Prinzip des *Scintillation Proximity Assay* (SPA).** Die SPA-Beads (grün) enthalten Szintillationspartikel, die stimuliert werden können Licht abzustrahlen. Diese Stimulation findet nur statt wenn das radioaktiv markierte Molekül (orange) an die Oberfläche des SPA-Beads bindet und die abgegebene Energie ausreicht die Partikel anzuregen. Das abgestrahlte Licht kann dann in Standard-Szintillationszähler vermessen werden. (aus <http://www5.amershambiosciences.com>, 2005)

Es wurden Streptavidin SPA-Beads (10 mg/ml) verwendet, um das biotinylierte Peptid 1 zu immobilisieren. Mittels Tritium-markierten Biotins konnte die Kapazität der SPA-Beads berechnet werden. Dafür wurden 0-130 pmol  $^3\text{H}$ -Biotin mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  SPA-Beads (entspricht 0,5 mg) für 30 min inkubiert und anschließend im Szintillationszähler vermessen. Die Stoffmenge wurde gegen die gemessenen cpm-Werte mit Hilfe des Programms SigmaPlot aufgetragen und eine Kurve mit der Gleichung 3-3 für einfach gesättigte Bindungen angepasst. Die Biotin-Dissoziationskonstante der

SPA-Beads konnte dann aus der Funktion abgelesen werden und eine Kapazität von ungefähr 108 pmol/mg berechnet werden.

$$y = \frac{B_{\max} \cdot c}{K_D + c} \quad (3-3)$$

$B_{\max}$  ist die maximale Bindung,  $c$  die Konzentration der Proben,  $y$  die gemessenen cpm-Werte und  $K_D$  die Dissoziationskonstante.

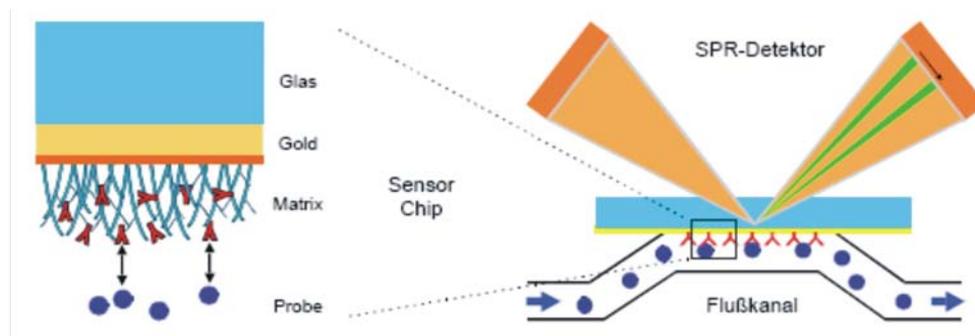
Im anschließenden Bindungsassay wurden Peptidkonzentrationen unterhalb des Sättigungsbereichs verwendet. Mit Hilfe des  $^3\text{H}$ -Biotin konnte auch ermittelt werden, dass nur ungefähr 30 % des cpm-Wertes mit den SPA-Beads gemessen wurde, der sonst für eine konventionelle Flüssigszintillationszählung zu erwarten gewesen wäre. Es wurden 0,4 mg (40  $\mu\text{l}$ ) Streptavidin SPA-Beads mit 20 pmol Peptid 1 (nicht gesättigter Konzentrationsbereich) für 30 min bei Raumtemperatur 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach konnten 20 pmol der jeweiligen Tritium-markierten RNA hinzugegeben werden, die vorher für 2 min bei 75 °C denaturiert und innerhalb einer halben Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und 300 rpm wurden die SPA-Beads abzentrifugiert (2 min, 13.000 x g) und im Szintillationszähler vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt.

### 3.2.8.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Oberflächen-Plasmonenresonanz Spektroskopie (SPR)

Die Messung der Dissoziationskonstante zwischen ausgewählten Aptameren und Peptid 1 konnte mit dem Gerät der Firma BIACORE (BIA = Bimolekulare Interaktionsanalyse) auf Streptavidin-Sensorchips durchgeführt werden. Der BIA-Technologie liegt das Phänomen der Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR = *surface plasmon resonance*) zu Grunde (Alves *et al.*, 2005; Liedberg *et al.*, 1995). An der Grenzfläche zwischen zwei optischen Medien (z.B. Glas und Wasser) wird das einfallende Licht an der Fläche des optisch dünneren Mediums reflektiert bzw. gebrochen. Fällt das Licht in einem Winkel größer als der kritische Einfallswinkel  $\theta_C$  ein, kann eine Totalreflexion beobachtet werden, bei der kein Licht mehr in das weniger dichte Medium übergeht. Jedoch dringt eine Komponente der elektromagnetischen Welle über eine kurze Distanz (in der Größenordnung einer Wellenlänge) in das optisch dünnere Medium ein. Da die Intensität der Welle exponentiell mit dem Abstand von der Grenzfläche abklingt, wird sie „verschwindende Welle“ (*evanescent wave*) genannt. Wenn die Grenzfläche zwischen den beiden Medien mit einer dünnen Schicht eines Metalls bedeckt ist, kann die elektromagnetische Welle sofern die Energien übereinstimmen mit den freien Elektronen der Metalloberfläche interagieren und absorbiert werden. Es kommt zur Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR) und einer Auslöschung eines Teils des reflektierten Lichts (Kretschmann & Raether, 1968). Der Winkel des reflektierten Lichts, unter dem SPR zu beobachten ist

(SPR-Winkel), wird von mehreren Faktoren bestimmt, u. a. den Eigenschaften des Metallfilms, der Wellenlänge des einfallenden Lichts und den Brechungsindizes der Medien auf beiden Seiten des Metallfilms. In der BIA-Technik werden die Wellenlänge, der Metallfilm und der Brechungsindex des dichteren Mediums (Prisma) konstant gehalten, so dass der SPR-Winkel direkt proportional zu dem Brechungsindex der wässrigen Lösung ist. Die zu messende Probe befindet sich auf dem Metallfilm im Bereich der Eindringtiefe der „verschwindenden Welle“, so dass eine Veränderung auf der Metallfläche, z.B. eine Gewichtszunahme, in einer Veränderung des Brechungsindex und so zu einer Veränderung des SPR-Winkels führt. Die Winkelveränderung wird schließlich detektiert und in ein Resonanzsignal umgewandelt. Da die Winkelveränderung sehr gering ist, muss eine ausreichend große Massezunahme auf der Goldoberfläche erfolgen, um ein verlässliches Signal hervorzurufen.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Sensorchip handelt es sich um eine auf ein Trägerglas aufgedampfte Goldoberfläche, auf der über eine Matrix Streptavidin gebunden worden ist. Die biotinylierten Peptide können so auf der Goldoberfläche immobilisiert werden und dienen als Ligand. Das Aptamer (Analyt) befindet sich in Lösung, die über eine Flußzelle am immobilisierten Peptid vorbeigeführt wird. Kommt es zur Bindung, ändert sich die Masse und somit der Winkel des ausgelöschten Bereichs. Abbildung 3-5 zeigt den Aufbau des SPR-Meßsystems.

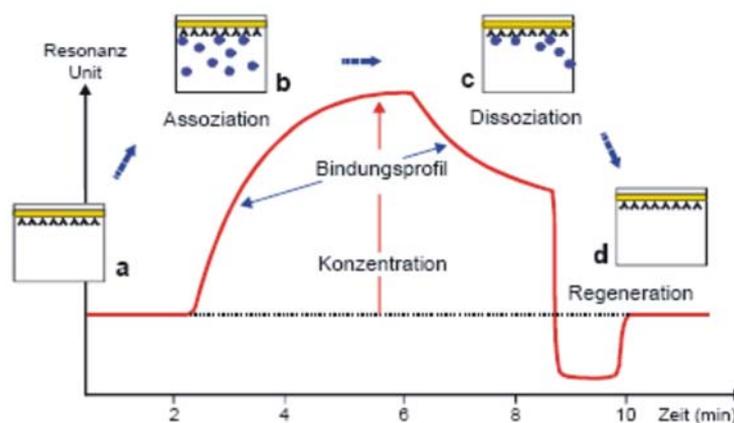


**Abbildung 3-5: SPR-Meßsystem.** Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger, einer Goldschicht und der Oberflächen-Matrix, an die der Ligand immobilisiert wird. Der Analyt wird in einem Fließsystem an dem Liganden vorbeigeführt. Der optische SPR-Detektor liegt an der Glasseite des Chips und misst die Massenzunahme der Matrix bei einem Bindungsereignis. Eine Bindung führt direkt zu einer Änderung des SPR-Winkels. Weniger als  $1\text{pg/mm}^2$  (=1 RU) können angezeigt werden. (aus *BIACORE® Basics*, 2005)

Ein Sensogramm, in Abbildung 3-6 dargestellt, zeigt die Veränderung des SPR-Winkels während eines Bindungsereignisses in Abhängigkeit von der Zeit. Die Stärke des Resonanzsignals wird in Resonanzeinheiten (RU) angegeben. Das Sensogramm verdeutlicht direkt die Assoziation und Dissoziation des Analyten an den Liganden.

Der Sensorchip wurde zunächst in das Fließsystem eingebaut und eine halbe Stunde mit HBS-P Puffer mit einer Geschwindigkeit von  $20\ \mu\text{l/min}$  gespült. Dann erfolgte die Immobilisierung des Peptid 1, indem  $40\ \mu\text{l}$  einer  $1\ \mu\text{M}$  Peptidlösung bei einer Geschwindigkeit von  $5\ \mu\text{l/min}$  in das System injiziert wurden. Nach einer weiteren Stunde Spülen mit HBS-P Puffer hatte sich wieder eine Basislinie

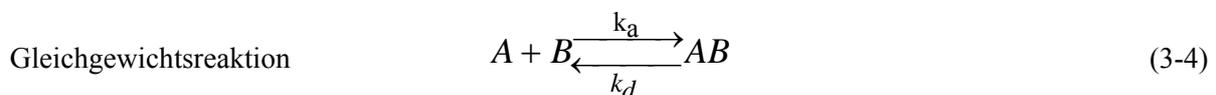
eingestellt und überflüssiges Peptid wurde gewegewaschen. Das Aptamer konnte injiziert und ein Sensogramm aufgenommen werden (5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Es wurden von jedem ausgesuchten Aptamer verschiedene Konzentrationen von 5 bis 1000 nM vermessen. Dabei musste auf der Oberfläche ein Gleichgewichtszustand erreicht werden, bei dem sich Assoziation und Dissoziation entsprechen, was im Sensogramm durch ein Plateau sichtbar wird. Die erhaltenen maximalen Resonanzeinheiten wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante konnte aus der angepassten Kurve nach Gleichung 3-3 berechnet werden. Der Chip wurde regeneriert, indem nacheinander bei 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  Fließgeschwindigkeit 80  $\mu\text{l}$  Lösung 1 (0,5 M NaCl, 2 M  $\text{MgCl}_2$ ), 60  $\mu\text{l}$  Lösung 2 (1 mM HCl) und 60  $\mu\text{l}$  Lösung 3 (1 M NaCl, 50 mM NaOH) injiziert und danach 1-2 h mit HBS-P Puffer gespült wurden. Nach ungefähr 20-30 Messungen musste ein neuer Chip verwendet werden.



**Abbildung 3-6: Typisches Sensogramm wie es mit der Software des BIACORE X Gerätes aufgenommen wird.** In den Kästchen ist der Zustand am Sensor Chip dargestellt. **a** Basislinie im Pufferfluss, **b** Probeninjektion, Bindung und Signalanstieg, **c** Dissoziation und Signalabfall im anschließenden Pufferfluss, **d** Basislinie nach der Regeneration (aus *BIACORE® Basics*, 2005).

### 3.2.8.3 Bindungsaffinitäten gegen zelluläres PrP<sup>C</sup> und oligomeres PrP

Die Affinität zwischen einem Aptamer und seinem Target wird durch die Dissoziationskonstante des gebildeten Komplexes beschrieben. Im Gleichgewicht gilt:



Wobei  $k_a$  die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation,  $k_d$  die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, A die RNA-Konzentration, B die Target-Konzentration und AB die RNA-Protein-Komplex-Konzentration darstellen. Über die einzelnen Geschwindigkeitsgleichungen und das Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht kann die Dissoziationskonstante  $K_D$  mit der Dimension M beschrieben werden.

$$\text{Assoziation} \quad \frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] \quad (3-5)$$

$$\text{Dissoziation} \quad -\frac{d[AB]}{dt} = k_d \cdot [AB] \quad (3-6)$$

$$\text{Im Gleichgewicht} \quad k_a \cdot [A] \cdot [B] = k_d \cdot [AB] \quad (3-7)$$

$$\text{Dissoziationskonstante} \quad K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad (3-8)$$

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten müssen die Konzentrationen des RNA-Liganden, des Targets und des gebildeten RNA-Protein Komplexes im Gleichgewicht ermittelt werden. Dazu wurde das Gleichgewicht zwischen RNA und Target als Funktion der Targetkonzentration bei gleichbleibender RNA-Konzentration betrachtet.

Dissoziationskonstanten der Bindung der Aptamere an PrP<sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer konnten mit Hilfe des *StrataClean*<sup>TM</sup> resin-Materials von der Fa. *Stratagene* abgeschätzt werden. Die siliciumbasierten Beads enthalten Hydroxylgruppen, die mit Proteinen in ähnlicher Weise interagieren wie die Hydroxylgruppen von Phenol, d. h. die Proteine lassen sich abzentrifugieren.

Die <sup>32</sup>P-markierten Aptamere wurden 2 min bei 75 °C in 1x Selektionspuffer 3 denaturiert und innerhalb einer halben Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. 0,1 µM gefaltete Aptamere wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0-5 µM) von PrP<sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer für 30 min in einem Volumen von 20 µl inkubiert und mit Cerenkov-Zählung vermessen. Um die ungebundenen RNA-Moleküle von den RNA-Protein Komplexen zu trennen, wurden 3 µl *StrataClean*<sup>TM</sup> resin zu dem Ansatz gegeben, 1 min inkubiert und 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen, das Pellet mit 20 µl Wasser gewaschen und in 20 µl Wasser im Szintillationszähler vermessen werden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus dem molarem Verhältnis der Zählprobe des Gesamtansatzes zu gebundener RNA konnte ein Prozentsatz an Bindung berechnet werden. Die prozentuale Bindung wurde gegen die variierte Konzentration der Proteine in einem halblogarithmischen Diagramm aufgetragen und mit dem Programm SigmaPlot analysiert. Mit Hilfe der allgemeinen Bindungsgleichung über eine nicht-lineare Regression konnten die Ergebnisse ausgewertet und die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Im Folgenden ist die allgemeine Bindungsgleichung für die Bindung der RNA an ein Target dargestellt:

$$[\text{Target}]_{\text{geb.}} = [\text{RNA} \cdot \text{Target}] = \frac{[\text{RNA}]_0 [\text{Target}]}{K_D (\text{RNA} \cdot \text{Target}) + [\text{Target}]} \quad (3-9)$$

wobei  $[\text{RNA}]_0$  die konstant eingesetzte RNA-Konzentration,  $[\text{Target}]$  die variierte Targetkonzentration,  $[\text{Target}]_{\text{geb.}}$  die gebundene Target-Konzentration im RNA-Target Komplex und  $K_D$  die Dissoziationskonstante bedeuten.

### 3.2.8.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine sensitive Methode, um kleinste Mengen an Antigenkonzentrationen bestimmen zu können. Das Antigen wird dabei auf einer Platte immobilisiert und mit dem Antikörper inkubiert, der spezifisch nur an das entsprechende Antigen bindet. Mittels eines zweiten Antikörpers, der spezifisch den ersten Antikörper erkennt, erfolgt die Amplifikation des Signals. Ein an den zweiten Antikörper gekoppeltes Enzym setzt ein lösliches, farbloses Chromogen zu einem löslichen, gefärbten und quantifizierbaren Farbstoff um, der dann detektiert werden kann.

**Tabelle 3-25: Pipettierschema für den ELISA.** Es wurden jeweils 1  $\mu\text{M}$  PrP<sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer mit und ohne 1  $\mu\text{M}$  RNA Klon 20 bzw. RNA-Bibliothek inkubiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde insgesamt 5-mal verdünnt, wobei die letzten 4 Verdünnungen (Verd. 2-5) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen wurden.

Standard- gerade[ng]	PrP <sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer		
	ohne Zusatz	+ RNA Klon 20	+ RNA- Bibliothek
0	Verd. 2	Verd. 2	Verd. 2
1,9			
3,9	Verd. 3	Verd. 3	Verd. 3
7,8			
15,6	Verd. 4	Verd. 4	Verd. 4
31			
62,5	Verd. 5	Verd. 5	Verd. 5
125			

Mit Hilfe der ELISA-Methode wurde eine Kontrolle zu dem *Strataclean<sup>TM</sup> resin*-Assay durchgeführt. Es wurde überprüft, ob sich PrP<sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer ohne Zugabe von RNA zentrifugieren lassen. Dazu erfolgte die Inkubation jeweils 1  $\mu\text{M}$  PrP<sup>C</sup> bzw. PrP-Oligomer mit und ohne 1  $\mu\text{M}$  RNA Klon 20 bzw. RNA-Bibliothek für eine halbe Stunde wie in Tabelle 3-23 zu entnehmen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angefertigt. Anschließend konnte für 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen werden. Von den Überständen wurde je eine 1 : 10 Verdünnung hergestellt (Verdünnung 1), die 4-fach weiter im Maßstab 1 : 2 verdünnt wurde (Verdünnung 2-5). Jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen 2-5 wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und getrocknet. Die Mikrotiterplatte wurde dann dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  2 %-iger Magermilchlösung für 1 h blockiert. Anschließend wurde 5-mal mit PBST- und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einer 1 : 10.000 Verdünnung des ersten Antikörpers (3F4-Anti-maPrP aus Maus,  $c_{\text{Stamm}} = 1,3 \text{ ng/ml}$ ) in 2 %-iger Magermilchlösung für 2 h. Danach wurde die Platte wieder wie oben gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege, 1:2000 Verdünnung) in 2 %-iger Magermilchlösung behandelt. Die Mikrotiterplatte wurde wieder gewaschen und abschließend mit 100  $\mu\text{l}$  der Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinedihydrochloride) für ungefähr 20 min inkubiert. Die Lösungen verfärbten sich bläulich durch den Umsatz des Substrats mit Hilfe der Peroxidase des zweiten Antikörpers. Durch die Zugabe von je 25  $\mu\text{l}$  2 M Schwefelsäure

konnte die Reaktion gestoppt werden. Die Lösungen verfärbten sich gelb und die Intensität der Farbe wurde dann bei 450 nm im ELISA-Messgerät vermessen.

### 3.2.8.5 Bindungsmotiv- und sekundär Strukturanalyse erhaltener Sequenzen

Die Primärstrukturanalyse der erhaltenen Sequenzen der Aptamere wurde sowohl mit Hilfe des Programms *ClustalX* als auch durch Zuordnung mit dem bloßen Auge durchgeführt. Das Computerprogramm *RNA-FOLD* (Zuker, 1989) berechnete Sekundärstrukturen, die ebenfalls miteinander verglichen wurden.

## 3.2.9 Biophysikalische Methoden

### 3.2.9.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Optisch aktive Substanzen sind in der Lage die Polarisationssebene bei linear polarisiertem Licht, das aus links- und rechtszirkular polarisiertem Licht zusammengesetzt ist, zu drehen. In Abhängigkeit von der Wellenlänge tritt bei optisch aktiven Molekülen eine unterschiedliche Absorption der links- und rechtszirkular polarisierten Komponenten des linear polarisierten Lichts auf, der Circular dichroismus. Gemessen wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht ( $\epsilon_L - \epsilon_R$ ), die als Elliptizität  $\Theta$  angegeben und in die molare Elliptizität  $[\Theta]$  umgerechnet wird:

$$\Theta(\lambda) = \text{const.} \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot l \quad (3-10)$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot MRW \cdot 100}{c \cdot l} \left[ \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \right] \quad (3-11)$$

Dabei bedeutet  $\Theta$  die gemessene Elliptizität,  $[\Theta]$  die molare Elliptizität, MRW die mittlere molare Masse (*mean residue weight*),  $l$  die Schichtdicke der Küvette und  $c$  die Konzentration der Probe. Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter liefern ein eindeutiges CD-Spektrum in einem Graph, bei dem die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen ist.

Die CD-Messungen wurden mit einem JASCO J-600 Spectropolarimeter unter Verwendung der dazugehörigen Software *Standard Measurement* und *Standard Analysis* durchgeführt. Die Lösungen konnten bei Raumtemperatur in einer Küvette mit einer Pfadlänge von 0,2 cm im fernen UV-Bereich von 250-190 nm vermessen werden. Dabei wurde das Protein PrP<sup>C</sup> (90-231) mit einer Konzentration von 9,2  $\mu\text{M}$  in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH = 5,8 und PrP<sup>C</sup> (23-231) mit Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0 eingesetzt. Um den Einfluß von RNA bzw. negativ geladenen Molekülen zu untersuchen, wurden zu dem vermessenen 5  $\mu\text{M}$  PrP<sup>C</sup> (23-231) jeweils 50-300 nM Aptamer S3-20 bzw. RNA-Bibliothek, 300 nM-300mM NaCl-Lösung oder 0,3-30  $\mu\text{M}$  NTPs gegeben und über einen Zeitraum von 5 min bis 18 h im CD-Spectropolarimeter gemessen. Es

wurden jeweils 3 Akkumulationen pro Spektrum bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min und einer Spektralweite von 1,0 nm aufgenommen und gemittelt sowie der Hintergrund subtrahiert.

### **3.2.9.2 Dynamic Light Scattering (DLS)**

Mit *Dynamic Light Scattering* können Partikelgrößen in Lösung untersucht werden. Das Prinzip der DLS-Methode beruht auf der Messung der Geschwindigkeit der Teilchen, die über die Stokes-Einstein-Gleichung mit ihrer Partikelgröße verknüpft sind. Eingestrahktes Laserlicht wird durch die sich ständig in Bewegung befindlichen Teilchen in alle Richtungen gestreut. Die Intensität des Streulichts in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Teilchen und damit ihrer Größe wird gemessen und analysiert. Die Geschwindigkeit ist außer von der Größe der Teilchen von der Diffusionsgeschwindigkeit, der Viskosität der Lösung und der Temperatur abhängig, weshalb diese Parameter konstant gehalten werden sollten.

Die DLS-Messungen wurden mit dem Spectroscatterer 202 der Firma *RiNA GmbH* bei einer Wellenlänge von 690 nm eines He-Ne Lasers und einer Energie im Bereich von 10-50 mW durchgeführt. Die Proben wurden in einer Quarzküvette bei 20 °C mit Hilfe einer Autopilotfunktion vermessen, bei der für 1 h im Minutenabstand 30 s-dauernde Messungen stattfanden. Es wurden zuerst jeweils 100 µM BSA, 30 µM PrP-Oligomer sowie 60 µM PrP<sup>C</sup> (23-231) über 15 min gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Aptamers S3-20 sowie der RNA-Bibliothek im molaren Verhältnis RNA : Protein von 1 : 300 zu den jeweiligen Proteinlösungen. Die Messungen wurden für weitere 45 min aufgezeichnet und in einem drei dimensional Diagramm mit dem Programm *Alldist* visualisiert.

