

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit Hilfe der *in vitro* Selektion hochaffine RNA-Moleküle (Aptamere) gegen die pathogene Form des Prionproteins als biochemischer Marker für TSE-Krankheiten gewonnen werden, die sensitiv zwischen den beiden Konformationen des Prionproteins unterscheiden und in diagnostischen Applikationen eingesetzt werden können. Um PrP^{Sc}-spezifische Aptamere zu generieren, wurden verschiedene SELEX-Strategien gewählt, die die Präsentation von Epitopen, die ausschließlich in der pathogenen Konformation zugänglich sind, beinhalten. Dabei wurde erstens infektiöses Material aus Hamsterhirnen als Zielmolekül verwendet (SELEX 1 bzw. SELEX 2). Eine Gegenselektion gegen die zelluläre Form des Prionproteins sollte die Spezifität der Aptamere erhöhen (SELEX 1). Zweitens wurde eine *in vitro* Selektion gegen ausgewählte konformationsspezifische Epitope des Prionproteins durchgeführt (SELEX 3) und drittens gegen *in vitro* aggregierte Oligomere, die lösliche Vorstufen auf dem Weg zu PrP^{Sc} darstellen (SELEX 4).

4.1 Überexpression und Reinigung des zellulären PrP^C

Rekombinantes PrP^C ist ein geeignetes Modell, um Bindungen und Eigenschaften des zellulären Prionproteins zu studieren. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit PrP^C aus *mesocricetus aureus* (Goldhamster) überexprimiert, gereinigt und in die native Konformation gefaltet. Im Detail wurde für die Gegenselektion der SELEX 1 (siehe 4.2.1) der globuläre C-terminale Bereich PrP^C (90-231) und für die Bindungsstudien (siehe 4.5) sowie die Untersuchungen zum Einfluss der RNA auf die Faltung von PrP^C (siehe 4.6) das gesamte Prionprotein PrP^C (23-231) verwendet.

Die Proteine wurden in *E.coli* mit einer zusätzlichen N-terminalen Affinitätssequenz (6x His-tag) überexprimiert, über den die Reinigung mit Hilfe einer Ni-NTA-Agarose-Säule gelang. Gleichzeitig mit der Reinigung wurde das immobilisierte Protein in die zelluläre Konformation gefaltet. Über einen Gradientenmischer wurde langsam das denaturierende Agens aus dem Puffer entzogen und das Protein konnte seine native Konformation ausbilden (Zahn *et al.*, 1997). Abbildung 4-1 zeigt die erfolgreiche Reinigung der Proteine PrP^C (90-231) mit einer Größe von 16 kDa und PrP^C (23-231) mit einer Größe von 23 kDa. In Abbildung 4-1, B kann die Überexpression des gewünschten PrP^C verfolgt werden.

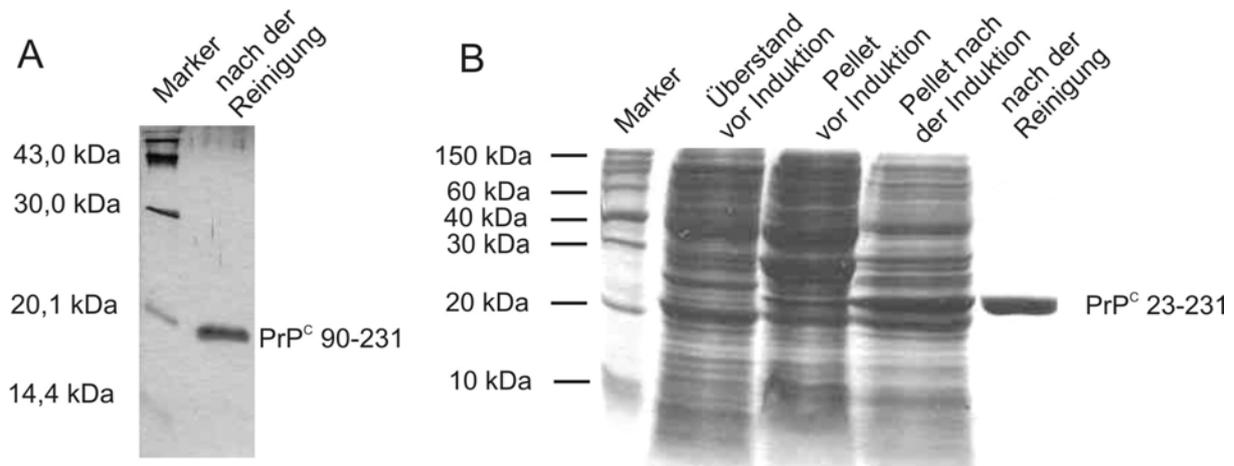


Abbildung 4-1: **A:** PrP^C (90-231) nach der Überexpression und Reinigung über Ni-NTA-Agarose. Das gereinigte Protein wurde auf ein 15 % SDS-Gel aufgetragen und mit Silberfärbung sichtbar gemacht. **B:** Verfolgung der Überexpression und der Reinigung von PrP^C (23-231). Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (12 %) aufgetragen und mit Coomassie angefärbt.

Die korrekte Faltung des Prionproteins in die zelluläre Konformation wurde mittels CD-Spektroskopie verfolgt. Abbildung 4-2 stellt das CD-Spektrum des nativ gefalteten PrP^C (90-231) bzw. PrP^C (23-231) dar. Die Spektren weisen Minima bei 208 und 222 nm auf, die auf eine α -helicale Struktur hindeuten. Bemerkenswert ist, dass beide Spektren völlig identisch aussehen, d.h. der unstrukturierte N-Terminus spielt im Circular dichroismus keine Rolle. Die Ergebnisse der PrP^C-Konformation stimmen mit den bereits in der Literatur beschriebenen Strukturuntersuchungen für PrP^C aus Hamster, Maus und Mensch überein (Mehlhorn *et al.*, 1996; Hornemann *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1999b), weshalb von einer korrekten Faltung ausgegangen werden kann.

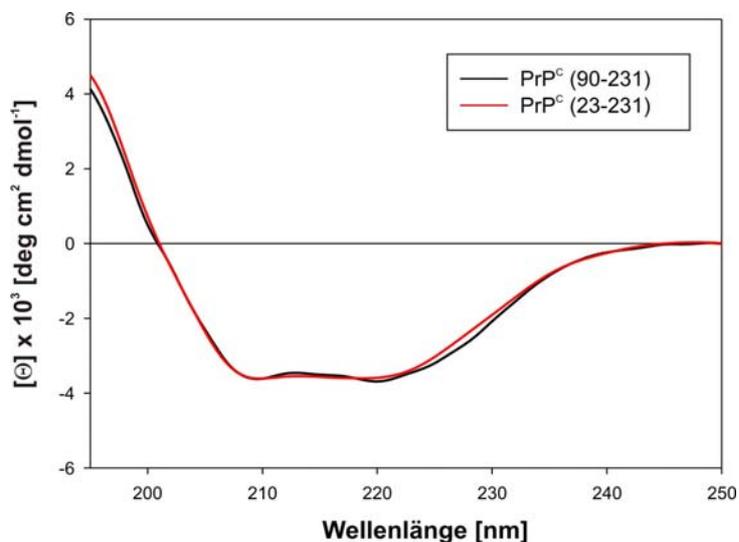


Abbildung 4-2: CD-Spektrum von PrP^C (90-231) (schwarz) bzw. PrP^C (23-231) (rot). Die Spektren sind aus 3 Einzelmessungen gemittelt und mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter aufgenommen worden. 9,2 μ M PrP^C (90-231) in 10 mM Natrium-phosphatpuffer, pH = 5,8 bzw. 5 μ M PrP^C (23-231) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0 wurden in einer Küvette mit einer Pfadlänge von 0,2 cm von 250-190 nm vermessen.

4.2 *In vitro* Selektionen

Für die vier verschiedenen SELEX-Experimente wurde jeweils eine spezielle Ausgangsbibliothek eingesetzt (Tab. 4-1, für die Sequenzen siehe Anhang 9.1). Durch den Einsatz von verschiedenen Bibliotheken konnten zum einen Kontaminationen der verschiedenen Selektionen untereinander vermieden werden, zum anderen wurde die Vielfalt an Molekülen bzgl. eines Targets erhöht. Die einzelnen *in vitro* Selektionen bauen logisch aufeinander auf und werden deshalb im Folgenden in der chronologischen Reihenfolge beschrieben.

Tabelle 4-1: Übersicht der verwendeten Bibliotheken in den unterschiedlichen SELEX-Experimenten

SELEX	Bibliothek	Art der Bibliothek	Zielmolekül
1	1	RNA	PrP ²⁷⁻³⁰ , Gegenselektion gegen PrP ^C
2	2	DNA	PrP ²⁷⁻³⁰
3	3	RNA	Peptid 1 bzw. Peptid 2
4	4	RNA	PrP-Oligomer O1

4.2.1 SELEX 1 gegen PrP²⁷⁻³⁰, Gegenselektion gegen PrP^C

4.2.1.1 Erstellung der Bibliothek 1 (RNA)

Die Bibliothek 1 umfasst RNA-Moleküle mit einer Länge von 100 nt. Zur Erstellung der RNA-Bibliothek wurde zuerst eine geeignete DNA-Matrize konstruiert und mittels Festphasensynthese chemisch synthetisiert. Die ssDNA-Bibliothek (Klußmann *et al.*, 1996) enthielt neben zwei äußeren Primerregionen von je 20 nt Länge einen randomisierten Kernbereich von 60 nt und wurde von der Firma IBA in einem Synthesemaßstab von 1 µmol erzeugt (für die Sequenz siehe Anhang 9.1). Der randomisierte Bereich entsteht während der Synthese durch den zufälligen Einbau der vier Nucleotide A, G, C und T. Dabei wird eine Lösung aus allen vier DNA-Phosphoramiditen verwendet, die die unterschiedliche Reaktivität der Phosphoramidite durch das Mischungsverhältnis dA : dG : dC : dT = 3 : 2,5 : 2,5 : 2 berücksichtigt.

Eine Zufallssequenz von 60 Nucleotiden in einer Bibliothek ergibt eine theoretische Anzahl von $4^{60} = 1,3 \cdot 10^{36}$ verschiedenen Molekülen, was ungefähr $2,2 \cdot 10^{12}$ mol entspricht. Bei einem Synthesemaßstab von 1 µmol und einer Ausbeute von 100 % sind maximal $6,0 \cdot 10^{17}$ Moleküle zu erwarten. Da die Syntheseausbeute aber nicht 100 % erreicht und Verluste durch

Reinigungsschritte (30 %) anfallen, wurde von einer Komplexität der synthetisierten DNA-Bibliothek von etwa $5,4 * 10^{16}$ verschiedener Moleküle ausgegangen.

Die einzelsträngige DNA-Bibliothek wurde mittels präparativer PCR in Doppelstränge überführt und amplifiziert. Gleichzeitig konnte über einen verlängerten Primer der T7-Promotor eingeführt werden, um die DNA-Bibliothek durch eine T7-Transkription in die entsprechende RNA-Bibliothek zu überführen. Abbildung 4-3 verdeutlicht die einzelnen Schritte zur Gewinnung der RNA-Bibliothek.

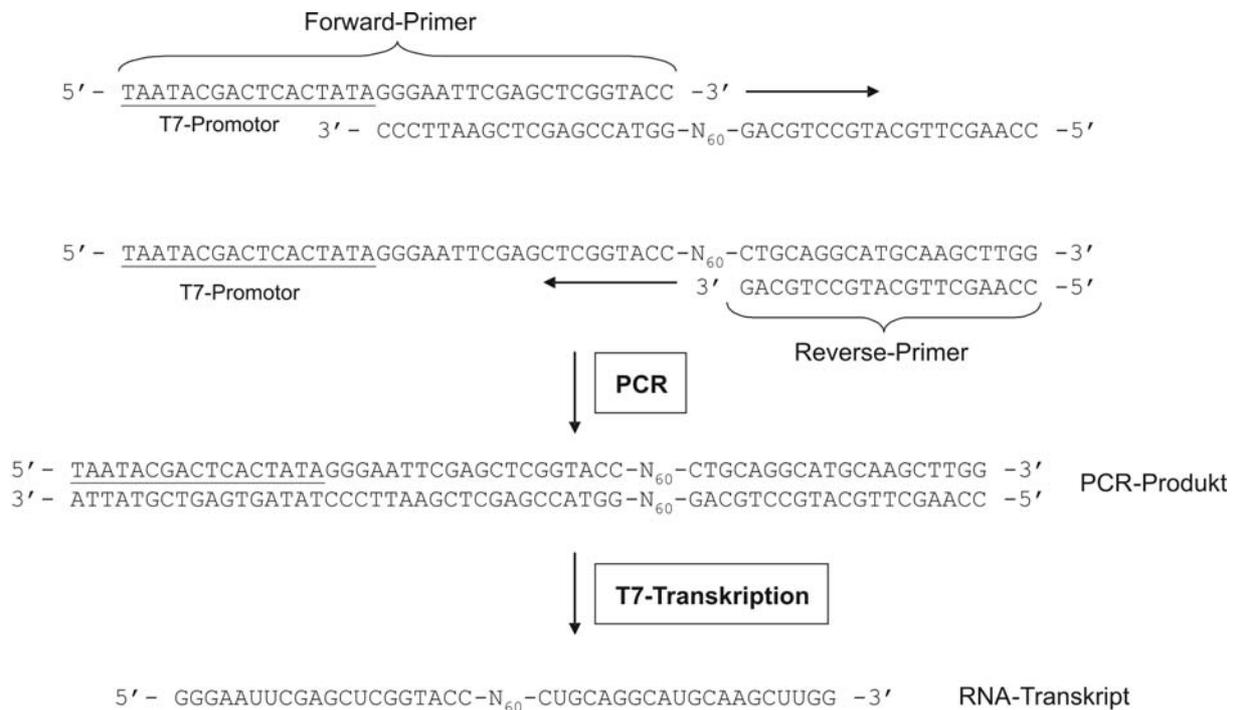


Abbildung 4-3: Erstellung der kombinatorischen RNA-Bibliothek. Die chemisch synthetisierte DNA-Matrize (100 mer) mit einem 60 Nucleotid langen randomisierten Bereich wird über eine PCR-Reaktion amplifiziert. Mit Hilfe des verlängerten Forward-Primers wird der T7-Promotor im ersten Zyklus eingeführt. Das doppelsträngige PCR-Produkt wird über T7-Transkription in RNA umgeschrieben. Die RNA-Transkripte sind 100 Nucleotide lang und bilden die RNA-Bibliothek.

Bei der präparativen PCR kam es darauf an, möglichst große Mengen an einzelsträngiger DNA in wenigen Zyklen in doppelsträngige DNA mit T7-Promotor umzuwandeln. Bei niedriger Zyklenzahl wurden gut amplifizierbare Sequenzen nicht bevorzugt vermehrt, so dass eine große Vielfalt an DNA-Molekülen in der Bibliothek gewährleistet war. Zur Ermittlung einer optimalen Amplifikationsrate bei möglichst wenigen Zyklen wurde zu der PCR-Reaktion radioaktives dCTP gegeben, die synthetisierten PCR-Produkte über ein PAA-Gel isoliert und quantifiziert. Bei der Bibliothek 1 konnte eine 6-fache Amplifikationsrate nach 10 Zyklen erzielt werden. Mittels präparativer PCR wurden 3,2 nmol ($2,0 * 10^{15}$ verschiedene Moleküle) einzelsträngige DNA amplifiziert. Von den doppelsträngigen PCR-

Produkten wurden ebenfalls 3,2 nmol für die anschließende präparative T7-Transkription eingesetzt. Bei der Transkription wurde ein Vermehrungsfaktor von 8 erreicht (25,6 nmol). Durch den anschließenden Reinigungsschritt über ein PAA-Gel ging ein Teil der RNA-Transkripte verloren, so dass schließlich ungefähr 21,2 nmol RNA vorlagen. Für die erste Selektionsrunde wurden davon 10 nmol (entspricht $6,0 \cdot 10^{15}$ verschiedenen Molekülen) verwendet. Da die Komplexität des Pools in der ersten Runde durch selektive Bindung herab gesetzt wurde und nach der PCR die verschiedenen Sequenzen des Pools in Kopie vorlagen, konnte in den folgenden Runden die eingesetzte RNA-Menge über 2,5 nmol auf 1 nmol verringert werden (siehe Material und Methoden, 3.2.7).

4.2.1.2 Durchführung der SELEX 1

Für die erste SELEX-Strategie wurde als Zielmolekül isoliertes PrP²⁷⁻³⁰ aus mit dem Scrapie-Stamm 263K infizierten Hamsterhirnen verwendet. Das pathogene Material wurde von der Gruppe von Dr. M. Baier am Robert-Koch Institut (Berlin) zur Verfügung gestellt. Im Laufe des Protokolls für die Anreicherung von infektiösen PrP²⁷⁻³⁰ aus Hirnen (Diringer *et al.*, 1997) wurden mehrmals Zentrifugationsschritte in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Da es sich bei dem infektiösen Material um unlösliche Aggregate handelt, befindet es sich nach der Zentrifugation im Pellet und kann so von Verunreinigungen abgetrennt werden. Diese Methode wurde auch für die Selektion eingesetzt, um gebundene RNA-Moleküle von nicht gebundenen Molekülen zu trennen. Abbildung 4-2 zeigt, dass sich das pathogene Material nach der Zentrifugation bei 100.000 x g ausschließlich im Pellet und nicht im Überstand befand.

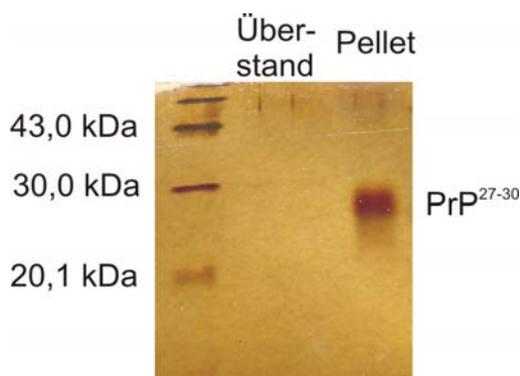


Abbildung 4-4: PrP²⁷⁻³⁰ nach Zentrifugation bei 100.000 x g für 1 h. Das gesamte infektiöse Material befindet sich ausschließlich im Pellet. Gezeigt ist ein 15 % SDS-PAGE, die Banden wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Während der Reinigung wurde das isolierte PrP^{Sc} mit Proteinase K behandelt, so dass es sich bei dem verwendeten Material um den Proteinase-resistenten Kern von PrP^{Sc} (PrP²⁷⁻³⁰) handelt. Während zelluläres Prionprotein vollständig durch Proteinase K verdaut wird, verbleibt bei der pathogenen Form ein resistenter Rest. Diese Methode eignet sich gut, um zwischen den beiden Prionkonformationen zu unterscheiden.

Ein weiterer Effekt des Proteinase K-Verdau ist der Abbau von RNAsen, die sich in der isolierten PrP²⁷⁻³⁰-Fraktion befinden können. Jedoch war trotz Proteinverdau und Ausweitung der finalen Waschschriffe der isolierten Fraktion PrP²⁷⁻³⁰ ein Rest an Verunreinigungen mit RNAsen vorhanden. Die RNA-Bibliothek wurde nach Inkubation mit isoliertem PrP²⁷⁻³⁰ vollständig degradiert (Abb. 4-5, Spur 2). Um einen frühzeitigen Abbau der RNA-Bibliothek zu verhindern, wurde dem Selektionsansatz RNase-Inhibitor der Firma *Fermentas* zugesetzt. Der RNase-Inhibitor bindet fest an RNAsen und inhibiert so ihre enzymatische Aktivität (Kobe und Deisenhofer, 1993; Blackburn, 1977). Abbildung 4-5 verdeutlicht, dass ein Abbau der RNA-Moleküle durch den Zusatz von 2,0 U/μl RNase-Inhibitor während der Selektion erfolgreich verhindert wurde. Während beim Zusatz von geringeren Konzentrationen RNase-Inhibitor Abbauprodukte der RNA zu erkennen sind, ist die RNA bei der Zugabe von 2,0 U/μl RNase-Inhibitor stabil (Abb. 4-5, Spur 6) und zeigt im Gel das gleiche Verhalten wie die Kontrolle (Abb. 4-5, Spur 1).

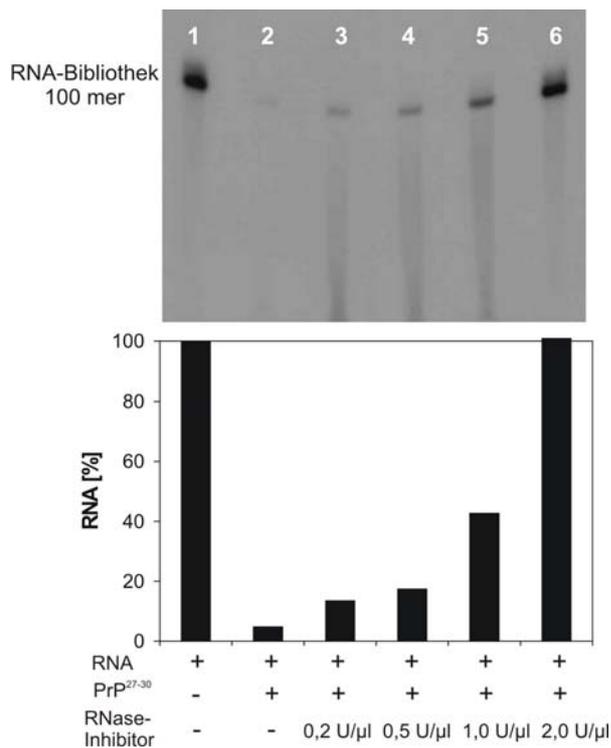


Abbildung 4-5: Einfluss von RNase-Inhibitor auf den Verdau der RNA-Bibliothek. 5 μM radioaktiv markierte RNA-Bibliothek wurden mit 1 μM PrP²⁷⁻³⁰ und unterschiedlichen Konzentrationen von RNase-Inhibitor in 100 μl Selektionspuffer 1 für 3 h inkubiert und auf ein 10 % PAA-Gel aufgetragen.

Für die Selektion und die Gegenselektion wurde ein Puffer verwendet (20 mM HEPES, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 0,01% (w/v) BSA), der physiologischen Bedingungen sehr nahe kommt und für andere Selektionsexperimente bereits mit geringen Abweichungen in den Konzentrationen der Komponenten beschrieben wurde (Rhie *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 1998; Tahiri-Alaoui *et al.*, 2002). Monovalente Kationen reduzieren die unspezifische Bindung an das Zielmolekül, divalente Kationen erleichtern und

fördern die Strukturbildung der RNA-Moleküle. Durch den Zusatz von BSA sollen unspezifisch bindende RNA-Moleküle abgetrennt werden.

Um die Stringenz der Selektion zu erhöhen, wurde vor der eigentlichen Selektion gegen das Zielmolekül PrP²⁷⁻³⁰ eine Gegenselektion mit zellulärem PrP^C durchgeführt. Auf diese Weise konnten Binder an PrP^C vor der Selektion aus dem RNA-Pool entfernt werden. Für die Gegenselektion wurde PrP^C (90-231) mittels *6x His-tag* an Ni-NTA-Agarose zu 95 % immobilisiert. Es wurde hier die verkürzte Form des Prionproteins (90-231) verwendet, um ein direktes Äquivalent mit dem Proteinase K-resistenten Teil des PrP^{Sc} zu erhalten. Immobilisiertes PrP^C wurde mit der hybridisierten RNA-Bibliothek (Verhältnis 6 : 1) im *Batch*-Verfahren inkubiert, dann wurde der Ansatz in eine Säule mit einer Membran gefüllt und nicht gebundene RNA-Moleküle wurden von der Säule gewaschen. Im Verlauf der einzelnen Selektionsrunden konnten 87-92 % des eingesetzten RNA-Pools von der Säule gespült und für die weiteren Selektionsexperimente eingesetzt werden.

Die Konzentrationsbestimmung des PrP²⁷⁻³⁰ erwies sich als schwierig, da die unlöslichen Aggregate nicht nach den herkömmlichen Methoden analysiert werden konnten. Es wurde auf Erfahrungswerte bei der Isolierung des pathogenen Prionproteins der Arbeitsgruppe von Dr. M. Baier (Robert-Koch-Institut, Berlin) zurückgegriffen: Aus einem Hamsterhirn können 20 µg PrP²⁷⁻³⁰ isoliert werden. Isolierte Fraktionen aus fünf Hamsterhirnen wurden in 200 µl Wasser resuspendiert, so dass sich eine Konzentration von 0,5 µg/µl einstellte.

Eine Anreicherung von affiner RNA an die Reaktionsgefäße wurde vermieden, indem die RNA nach der Gegenselektion und vor der eigentlichen Selektion bei 125.000 x g zentrifugiert wurde (Präselektion gegen die Matrix). In der ersten Runde wurden nur 0,2 % der RNA-Bibliothek präzipitiert, der Wert stieg allerdings in den folgenden Runden auf bis zu 10,4 % an.

Der Überstand nach der Zentrifugation der RNA-Bibliothek wurde abgenommen und schließlich mit dem Zielmolekül PrP²⁷⁻³⁰ in einem ungefähren Verhältnis RNA : Zielmolekül von 5 : 1 und einer finalen RNase-Inhibitor Konzentration von 2 U/µl in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Der Ansatz präzipitierte bei 100.000 x g nach 30 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge. Der RNA-Protein Komplex lag im Pellet vor, während sich im Überstand nur freie RNA-Moleküle befanden. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet einmal gewaschen und schließlich im Szintillationszähler vermessen. Der RNA-Protein Komplex konnte mit Harnstoff denaturiert und die gebundene RNA isoliert werden.

In der ersten Runde wurden 0,25 % der RNA-Bibliothek an das Zielmolekül gebunden. Bis zur zehnten Runde blieben die Werte der gebundenen RNA ungefähr auf einem gleichen

Niveau von etwa 0,4 %. Danach konnte die Bindung der RNA an das Zielmolekül etwas erhöht werden, jedoch schwankten die Werte der letzten fünf Runden sehr stark zwischen 0,6 und 1,7 %. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung lagen diese Werte der pelletierten RNA im Bereich um 1 %, d.h. im Vergleich zur ersten Runde wurde nur ein 5-facher Anstieg erreicht. Eine signifikante Anreicherung der Bibliothek mit PrP²⁷⁻³⁰-Bindern innerhalb der insgesamt 15 Selektionsrunden konnte nicht beobachtet werden, weshalb die Selektion beendet wurde. Die in den einzelnen Runden selektierten prozentualen Anteile der RNA sind in Abbildung 4-6 visualisiert worden.

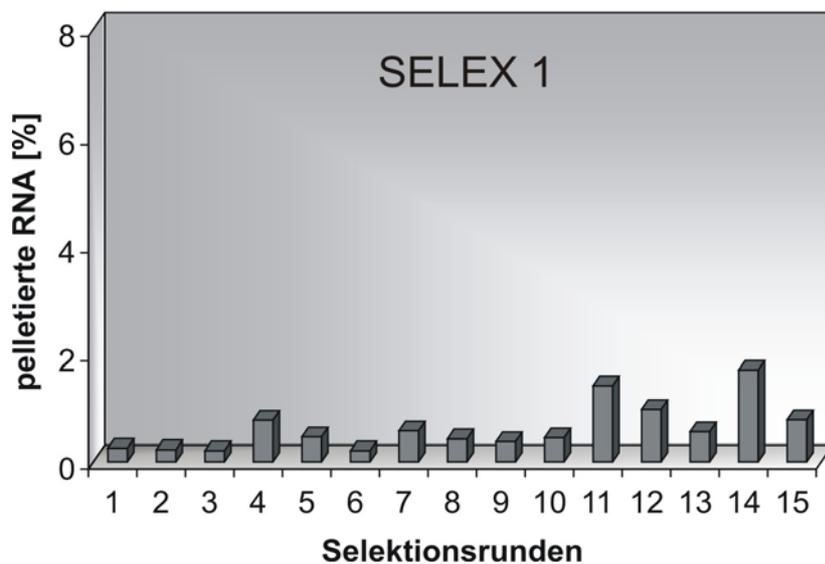


Abbildung 4-6: Anteil der selektierten RNA je Selektionsrunde der SELEX 1. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil an RNA-Molekülen, die sich nach der Zentrifugation im Pellet befanden und somit an das Zielmolekül binden konnten. Die Werte wurden aus Doppelbestimmungen gemittelt.

4.2.2 SELEX 2 gegen PrP²⁷⁻³⁰

Ein Hauptproblem der ersten SELEX war die Instabilität der RNA gegenüber dem Zielmolekül, weshalb zu dem Selektionsansatz immer RNase-Inhibitor hinzugesetzt werden musste. Um das Hinzufügen einer zusätzlichen Komponente zu umgehen, wurde während der zweiten SELEX eine DNA-Bibliothek verwendet. Abbildung 4-7 zeigt deutlich, dass die DNA-Moleküle während einer 5-stündigen Inkubation mit den isolierten Aggregaten nicht nachweisbar abgebaut wurden.

4.2.2.1 Erstellung der Bibliothek 2 (DNA)

Für eine DNA-Bibliothek wurden genauso wie für eine RNA-Bibliothek zuerst einzelsträngige DNA-Matrizen chemisch synthetisiert. Die DNA-Bibliothek 2 (siehe Anhang 9.1) wurde nach Murphy *et al.* (2003) von der Firma IBA im Synthesemaßstab von 1 µmol hergestellt. Die DNA-Moleküle waren 88 nt lang, wobei ein randomisierter Bereich aus 50 Nucleotiden von konstanten Primerregionen aus 18 bzw. aus 20 nt flankiert wurde. 8 nmol

($3,8 \cdot 10^{15}$ verschiedene Moleküle) der chemisch synthetisierten Bibliothek wurden mit einer Amplifikationsrate von sechs innerhalb von 15 PCR-Zyklen vermehrt.

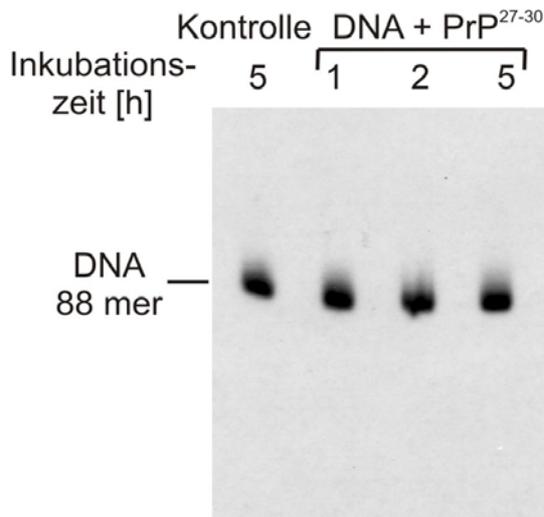


Abbildung 4-7: Einfluss von isoliertem PrP²⁷⁻³⁰ auf die DNA-Bibliothek. 1 μ M radioaktiv markierte DNA-Bibliothek wurde 1 bis 5 h mit 1 μ M isoliertem PrP²⁷⁻³⁰ inkubiert und anschließend auf einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt.

Nach der Amplifikation lag die DNA allerdings im Doppelstrang vor, der für den Einsatz in der Selektion aufgetrennt werden musste. Für die *in vitro* Selektion wird nur ssDNA verwendet, da komplexe intramolekulare Strukturen, die mit anderen Molekülen spezifisch in Wechselwirkung treten, nur von einzelsträngigen Oligonucleotiden ausgebildet werden können. Zur Strangtrennung wurde eine PCR mit einem speziellen Primer, der einen Hexaethylglycol-Linker und eine Verlängerung des Primers um 20 Nucleotide enthält (Williams und Bartel, 1995), durchgeführt, so dass sich für die beiden DNA-Stränge eine unterschiedliche Größe und ein verändertes Laufverhalten in einem denaturierendem Polyacrylamidgel ergaben. Nach der Reinigung konnten allerdings nur noch 21 % (10,3 nmol) einzelsträngige DNA-Moleküle gewonnen werden, wovon 3,2 nmol (etwa $2,6 \cdot 10^{14}$ verschiedene Moleküle) für die erste Selektionsrunde eingesetzt wurden. Für die folgenden Runden wurde die verwendete Menge an DNA über 2,0 nmol auf 0,5 nmol reduziert (siehe Material und Methoden, 3.2.7).

4.2.2.2 Durchführung der SELEX 2

Für die zweite SELEX wurde der Selektionspuffer 2 (20 mM HEPES, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,01% (w/v) BSA) verwendet, der im Vergleich zum Selektionspuffer 1 eine höhere Magnesiumkonzentration aufweist, um die Faltung der DNA-Moleküle zu stabilisieren. Zusätzlich wurde die negative Ladung des Nucleinsäurerückgrats durch die positiven Mg-Ionen komplexiert, so dass eine Bindung an das Zielmolekül begünstigt wurde. Um die Stringenz der Selektion zu verringern und weiterhin günstige

Bedingungen für eine Bindung zu schaffen, wurde die Gegenselektion während dieses SELEX-Experiments unterlassen. Sonst erfolgte die Durchführung der Selektion wie für SELEX 1 beschrieben.

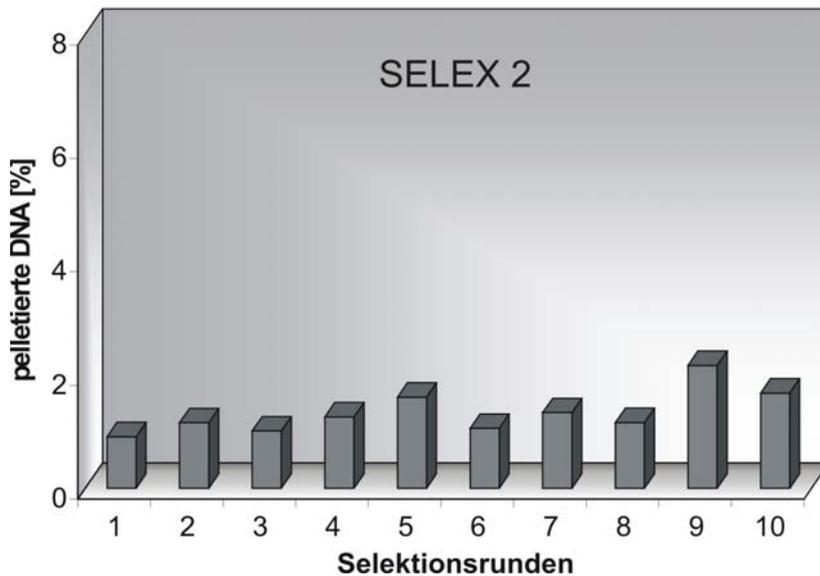


Abbildung 4-8: Anteil der selektierten DNA je Selektionsrunde der SELEX 2. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil an DNA-Molekülen, die sich nach der Zentrifugation im Pellet befanden und somit an das Zielmolekül binden konnten. Die Werte wurden aus Doppelbestimmungen gemittelt.

Während der Präselektion gegen die Matrix wurden nur geringe Mengen (0,4-1,5 %) der DNA-Bibliothek pelletiert. In der ersten Selektionsrunde konnten 0,91 % DNA an das Zielmolekül gebunden werden. Gegenüber der RNA-Bibliothek, die in der ersten Selektionsrunde nur zu 0,25 % gebunden hat, ist unter gleichen Bedingungen eine höherer Bindungshintergrund festzustellen, der einmal durch ein anderes Bindungsverhalten der DNA an das Zielmolekül, aber auch durch die größere Stabilität der DNA in Gegenwart von PrP²⁷⁻³⁰ erklärt werden kann. Insgesamt wurden 10 Selektionsrunden durchgeführt, in deren Verlauf keine signifikante Anreicherung der DNA-Bibliothek und Selektion von Aptameren festgestellt werden konnte. Die Werte für die gebundene DNA pendelten um 1,4 %, was wahrscheinlich einem Hintergrund an unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und PrP²⁷⁻³⁰ entsprach. Abbildung 4-8 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Selektionsrunden.

4.2.2.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung von PrP²⁷⁻³⁰

Eine Erklärung für die ausgebliebene Anreicherung an affinen Oligonucleotiden könnte im Zielmolekül PrP²⁷⁻³⁰ liegen. Isoliertes PrP²⁷⁻³⁰ sollte nach dem eingesetzten Reinigungsprotokoll in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Prion-Fibrillen von etwa 50-100 nm Länge zeigen (Diringer *et al.*, 1997). Bis heute ist die Struktur der pathogenen Form des Prionproteins nicht bekannt. Es existieren lediglich Modelle (Goevarts *et al.*, 2004; DeMarco *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002), so dass keine Aussage über die exakte Struktur der

Aggregate gemacht werden können. Es wurde allerdings von einem symmetrischen Aufbau der Fibrillen ausgegangen. Alle Modelle vermuten auch eine symmetrische Anordnung der fehlgefalteten Prionproteine wie z. B. eine 3_1 Symmetrieachse (DeMarco *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit aufgenommene elektronenmikroskopische Bilder (Abb. 4-9) verdeutlichen, dass es sich bei dem in den SELEX-Experimenten verwendeten pathogenen Material nicht um die erwarteten Fibrillen handelte, sondern vielmehr um undefinierte unsymmetrische Ansammlungen von PrP²⁷⁻³⁰ mit einer Größe von 200-300 nm. Auch durch Ultraschallbehandlung konnten die großen Aggregate nicht wesentlich verkleinert werden. Durch die Bildung dieser undefinierten Aggregate könnte die Oberfläche verringert sein, so dass mögliche Bindungsepitope teilweise verdeckt oder sogar im Inneren maskiert vorlagen. Außerdem ist der symmetrische Aufbau der Fibrillen völlig zerstört. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten auch, dass die isolierte pathogene Fraktion Verunreinigungen von anderen Proteinen wie Collagen enthielt. Zusammenfassend war das verwendete isolierte PrP²⁷⁻³⁰ wegen seiner Inhomogenität nicht als Target für die *in vitro* Selektion geeignet. Bei der *in vitro* Selektion ist die Verwendung eines homogenen Zielmoleküls, das in jeder Runde die gleichen Epitope präsentiert, eine zwingende Voraussetzung für die Anreicherung von affinen Bindern. Ist das Zielmolekül inhomogen, werden in jeder Runde andere Moleküle selektiert und es können sich keine Aptamere anreichern.

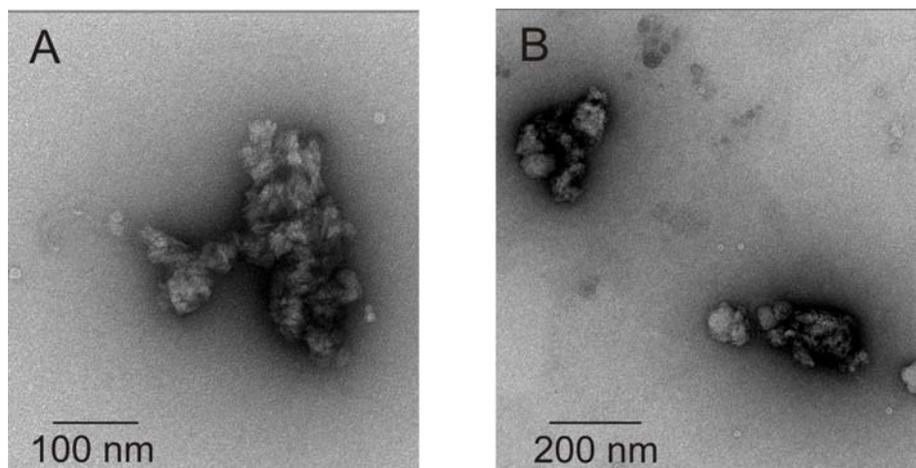


Abbildung 4-9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Morphologie von isoliertem PrP²⁷⁻³⁰. Eine Suspension aus 0,5 µg/µl isoliertem PrP²⁷⁻³⁰ wurde für 1 min mit Ultraschall behandelt und mit 2 % Uranylacetat gefärbt. Die Balken repräsentieren 100 nm (A) bzw. 200 nm (B). Die Aufnahmen entstanden mit Unterstützung von Dr. Rudi Lurz am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin.

4.2.3 SELEX 3 gegen konformationsspezifische Epitope des Prionproteins

4.2.3.1 Auswahl der Epitope

Da das zur Verfügung gestellte Zielmolekül PrP²⁷⁻³⁰ für das Selektionsexperiment scheinbar ungeeignet war (siehe 4.2.2.3), wurde nach einer anderen Strategie gesucht, um Aptamere gegen das pathogene Prion zu generieren. Die pathogene und die zelluläre Form des Prionproteins unterscheiden sich nur in ihrer Konformation. Deshalb ist es erforderlich, konformationsspezifische Epitope zu finden, die nur in einer der beiden Konformationen bevorzugt zugänglich sind.

Es ist bekannt, dass PrP^{Sc} einen höheren β -Faltblatt- und einen geringeren α -Helix-Anteil aufweist als PrP^C (Pan *et al.*, 1993; Pergami *et al.*, 1996). Die Umfaltung ist assoziiert mit einer größeren Exposition hydrophober Aminosäurereste an der Oberfläche des Proteins. Ein acider pH-Wert fördert die Umfaltung des Prionproteins in seine β -Faltblatt-reiche Konformation (Swietnicki *et al.*, 1997; Hornemann *et al.*, 1998; Jackson, *et al.*, 1999a; Zahn, 2003). Paramithiotis *et al.* (2003) konnten mit Tyrosin-spezifischer Fluoreszenz zeigen, dass bei niedrigem pH Tyrosinseitenketten bevorzugt an der Proteinoberfläche exponiert werden. In der Sequenz des Prionproteins erscheinen an drei Stellen zwei benachbarte Tyrosinreste, die in allen untersuchten Spezies konserviert ist. Die ersten beiden Tyrosinpaare werden von einem Argininrest benachbart (YYR), das dritte Paar von einem Aspartatrest flankiert (YYD).

In Abbildung 4-10 sind die Motive, zusammengefasst als YYX-Motive, in gelb dargestellt. Das erste YYR-Motiv befindet sich in der α -Helix 1 (Reste 149-151), das zweite Motiv in dem zweiten β -Faltblattstrang (Reste 162-164) und das YYD-Motiv am Ende der letzten α -Helix (Reste 225-227), wo das Protein über einen GPI-Anker an der Zellmembran befestigt ist. Das Kalottenmodell des strukturierten C-Terminus (Abb. 4-10, B) zeigt, dass die Tyrosinreste in der zellulären Konformation verborgen und nicht zugänglich sind. Bei der Umfaltung des Prionproteins ist wahrscheinlich mindestens eines der YYX-Motive involviert und liegt an einer exponierten Region im Protein. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um das Motiv in dem β -Faltblattstrang 2 handelt (Paramithiotis *et al.*, 2003). Das YYX-Motiv bildet ein selektives Epitop für die fehlgefaltete Konformation des Prionproteins. Studien mit geeigneten Antikörpern belegen weiterhin, dass die Region die Aminosäurereste 132-156 umfassend (enthält ein YYR-Motiv, Novitskaya *et al.*, 2006) sowie die Regionen AS 115-130 und AS 220-231 (enthält ein YYD-Motiv, Pan *et al.*, 2004) in PrP^C verborgen, dafür aber in PrP^{Sc} zugänglich sind.

Paramithiotis *et al.* (2003) konnten erfolgreich monoklonale Antikörper herstellen, indem sie Kaninchen mit den Peptiden der ausgewählten Sequenzen CYYR bzw. CYYRRYYRYY immunisierten. Diese Antikörper sind in der Lage PrP^{Sc} aus *scrapie*-infizierten Hirnhomogenat, aber nicht PrP^C zu immunopräzipitieren. Aus Hirnhomogenat von gesunden Tieren wurde auch kein PrP^C gebunden, was darauf hindeutet, dass das Epitop tatsächlich nur in der pathogenen Konformation zugänglich ist.

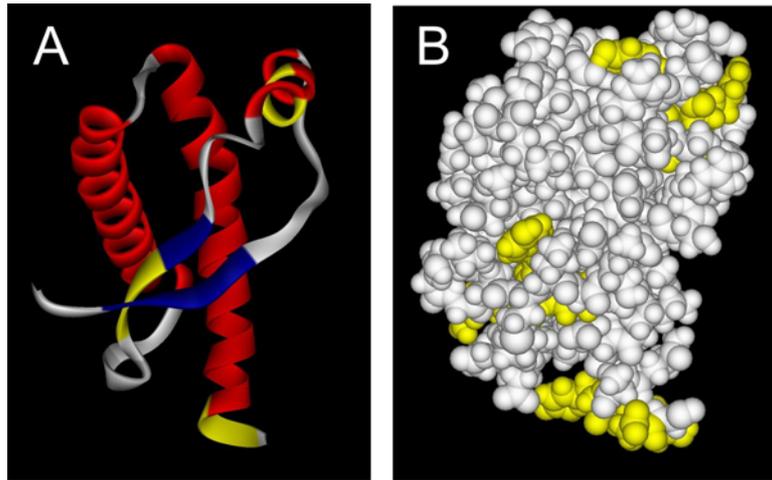


Abbildung 4-10: NMR-Struktur des rekombinanten PrP^C aus Goldhamster, C-Terminus 125-228 (James *et al.*, 1997). A: Band- (*ribbon*) Darstellung, α -Helices sind rot, β -Faltblatt sind blau und YYX-Motive sind gelb dargestellt. B: Kalottenmodell, YYX-Motive sind gelb gefärbt.

Eine der oben genannten YYR-Motive befindet sich in der aus den Aminosäureresten 144-154 bestehenden α -Helix 1. Es wird vermutet, dass dieser Teil des Prionproteins in die Umfaltung involviert ist und eine wichtige Rolle bei der Aggregation spielt (Prusiner, 1998). Biochemische und biophysikalische Daten deuten darauf hin, dass diese Region in den beiden Konformationen PrP^C und PrP^{Sc} eine unterschiedliche Struktur einnimmt (Eghiaian *et al.*, 2004); dagegen scheinen Helix 2 bzw. Helix 3 in beiden Konformationen konserviert zu sein. Antikörper, die Teile von Helix 2 bzw. Helix 3 als Epitop besitzen, können sowohl an PrP^{Sc}, als auch an PrP^C binden (Peretz *et al.* 1997; Eghiaian *et al.*, 2004). Außerdem ist die Disulfidbrücke zwischen Helix 2 und 3 bei PrP^{Sc} noch immer intakt (Zhang *et al.*, 1997; Welker *et al.*, 2002). Eberl und Glockshuber (2002) untersuchten Deletionsvarianten von PrP^C (121-231) und fanden Helices 2 und 3 in stabiler α -Helix-Form. Auch *molecular dynamics*- Simulationen ergeben ein Modell für PrP^{Sc}, indem die beiden Helices 2 und 3 stabil bleiben (DeMarco *et al.*, 2004; Govaerts *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2001).

Die Umfaltung in die pathogene Form und der Verlust von α -helicaler Struktur werden wahrscheinlich von Helix 1 bzw. den benachbarten Aminosäuren ausgehen. Diese Helix

besitzt eine der hydrophilsten Sequenzen in der Proteindatenbank (Morrissey und Shakhnovich, 1999) und eine niedrige Kapazität, tertiäre hydrophobe Wechselwirkungen auszubilden. Deshalb wird die Helix über elektrostatische Interaktionen wie Salzbrücken zwischen Arginin- und Aspartatresten (Asp144/Arg148 und Arg147/Asp151) stabilisiert (Morrissey und Shakhnovich, 1999). Der Wegfall der Salzbrücken ist zwar nicht kritisch für die Umfaltung, jedoch wird die Stabilität der Helix herabgesetzt und die Fehlfaltung kann mit höherer Effizienz verlaufen (Speare *et al.*, 2003). Untersuchungen mit verschiedenen Salzlösungen und pH-Werten führten auch zu dem Ergebnis, dass die Helix 1 thermodynamisch instabil ist und elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle in der Stabilität der Helix spielen (Apetri und Surewicz, 2003; Morillas *et al.*, 2001). Calzolari und Zahn (2003) konnten die Labilität der S1-H1-S2 Region in huPrP mit Hilfe von NMR-Spektroskopie unter sauren Bedingungen zeigen. Bei pH = 4,5 war das gesamte Protein stärker positiv geladen, so dass die elektrostatischen Wechselwirkungen der Helix 1 destabilisiert wurden und Helix 1 mit dem β -Faltblatt 2 als eine Art „Startpunkt“ für die Umfaltung agieren konnte.

Der Hinweis der Instabilität des N-terminalen Teils von Helix 1 wird außerdem gestützt durch die Beobachtung des schnellen Austauschs von Wasserstoffatomen im Vergleich mit anderen Sekundärelementen des Prionproteins. Die Untersuchung eines Peptides mit den Aminosäurenresten 142-166 mittels NMR- und CD-Spektroskopie zeigte die Ausbildung einer stabilen β -Hairpin-Struktur. Dieses Peptid besitzt eher die Tendenz sich aufzufalten und eine β -Struktur anstelle einer α -Helix einzunehmen, was die Instabilität der Region unterstreicht (Kozin *et al.*, 2001). Ein Peptid mit den Resten 125-170 aggregiert sogar unter physiologischen Bedingungen (Sharman *et al.*, 1998).

Die Helix 1 ist außerdem Teil von Antikörper-Epitopen, die spezifisch PrP^{Sc} erkennen können (Korth *et al.*, 1997; Moroncini *et al.*, 2004; Paramithiotis *et al.*, 2003). Antikörper, die auch in dieser Region an PrP^C (White *et al.*, 2003b; Peretz *et al.*, 2001) bzw. an beide Konformationen binden können (Korth *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1991), sind in der Blockierung der Formation von PrP^{Sc} involviert. Diese Hinweise deuten auf eine unterschiedliche Struktur der Region um die Helix 1 in PrP^C und PrP^{Sc} hin.

Die obigen Ausführungen verdeutlichen, dass durch die Auswahl von geeigneten Epitopen eine Unterscheidung zwischen der pathogenen und der zellulären Konformation des Prionproteins getroffen werden kann. Deshalb wurden die Peptide 1 und 2 konstruiert, die solche konformationsspezifischen Epitope abbilden (Abb. 4-11), um in der Selektion als Target eingesetzt zu werden. Peptid 1 leitet sich von der Sequenz ab, die Paramithiotis *et al.*

(2003) zur Gewinnung der PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper verwendet haben. Es beinhaltet die YYR-Motive der Primärstruktur des Prionproteins und besteht insgesamt aus nur drei verschiedenen Aminosäuren. Die drei Glycinreste wurden zusätzlich zur Aminohexansäure (Ahx) als Abstandhalter eingeführt. Bei dem Peptid 2 handelt es sich um einen Teil der Prionproteinsequenz aus Goldhamster, die sich über die Aminosäurereste 136-158 erstreckt und sowohl die Sequenz für die Helix 1 als auch ein YYR-Motiv einschließt. Beide Peptide sind am N-Terminus über einen Linker mit Biotin verbunden, damit sie für die Selektionsexperimente immobilisiert werden konnten.

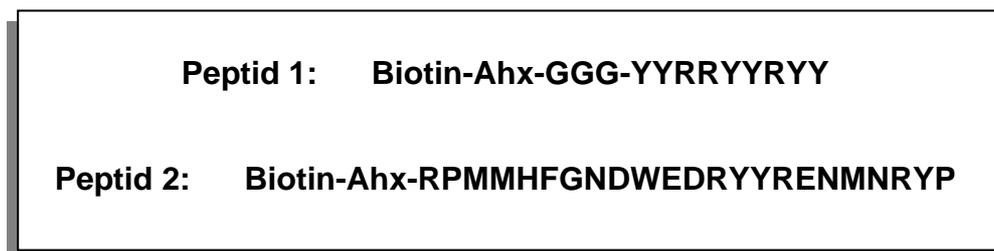


Abbildung 4-11: Sequenzen der verwendeten Peptide. Bei dem Peptid 1 handelt es sich um ein konformationelles Epitop (Paramithiotis *et al.*, 2003), Peptid 2 spiegelt die Sequenz des Prionproteins aus Goldhamster (Aminosäurereste 136-158) wider.

Peptide besitzen als Zielmoleküle für die Selektion einige Vorteile. Durch die chemische Synthese liegen sie in hoher Reinheit vor, so dass keine Verunreinigungen zum RNA-Abbau führen können. Die Peptide haben außerdem den Vorteil sich leicht immobilisieren zu lassen und bereits ein Epitop des Proteins zu präsentieren. Das Zielmolekül kann ganz nach den Anforderungen des Experimentators maßgeschneidert werden. Es wurden bereits Aptamere gegen Peptide generiert, die schließlich auch erfolgreich an das gesamte Protein binden konnten (Xu and Ellington, 1996; Proske *et al.*, 2002a; Blind *et al.*, 1999; Purschke *et al.*, 2006).

4.2.3.2 Physikalische Charakterisierung der Peptide 1 und 2

Für die Selektion ist es wichtig, dass unter den gewählten Bedingungen die Peptide immer die gleiche Konformation einnehmen. In der Literatur sind bereits ähnliche Sequenzen zu Peptid 2 mit Hilfe der NMR- und CD-Spektroskopie untersucht worden. Ziegler *et al.* (2003) beschäftigten sich mit Peptiden, die die Aminosäurereste 110-157, 140-158 und 140-166 umfassen. Diese Peptide bilden stabile α -Helices aus, die auch unter verschiedenen Bedingungen wie hohe Salzkonzentrationen, niedrigem pH oder organischen Lösungsmitteln erhalten bleiben. Helix 1 scheint in Lösung stabil zu sein, wenn es isoliert in Form eines

Peptids vorliegt. Unter dem Einfluss der Umgebung im Prionprotein wird die Helix 1 durch geringe äußere Veränderungen instabil und neigt zu Umfaltungen. Die Aminosäurereste 143-158 bilden sowohl unter sauren als auch unter neutralen Bedingungen eine stabile α -Helix aus (Liu, 1999). In Wasser liegt der α -helikale Anteil bei ungefähr 40 %; durch Zugabe von Trifluoroethanol wird die intrinsische Helixeigenschaft des Peptids noch erhöht.

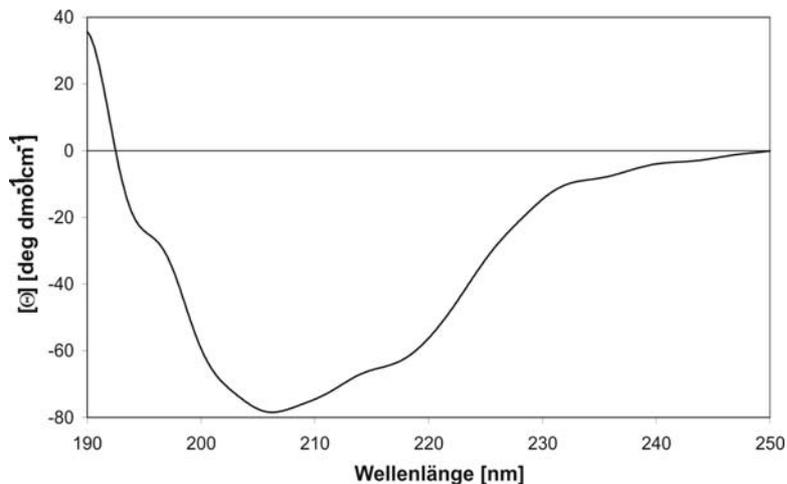


Abbildung 4-12: CD-Spektrum des Peptids 2. Das Spektrum ist ein Mittel aus 3 Einzelmessungen, aufgenommen mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter. 220 μ M Peptid 2 in 1x Selektionspuffer 3 wurde von 250-190 nm vermessen.

Das CD-Spektrum des Peptids 2 (Reste 136-158) wurde in Selektionspuffer 3 aufgenommen und zeigt Minima bei ungefähr 206 nm und 218 nm (Abb. 4-12). Die Werte sind gegenüber einer optimalen α -Helix (208 nm und 222 nm) leicht zu kleineren Wellenlängen verschoben, jedoch stimmen die Ergebnisse mit den Spektren von Ziegler *et al.* (2003) für das Peptid mit den Resten 140-158 überein. Peptid 2 liegt demnach unter den Selektionsbedingungen zum größten Teil in α -helikaler Form vor.

Von Peptid 1 konnte kein CD-Spektrum aufgenommen werden, das bekannte Sekundärstrukturelemente aufwies. Da das Peptid nur aus drei verschiedenen Aminosäuren besteht und insgesamt sehr kurz ist, war eine höhere Struktur nicht erwartet worden. In diesem Fall handelt es sich um ein konstruiertes, konformationsspezifisches Epitop, das in der Sequenz des Prionproteins so nicht enthalten ist. Die Präsentation des YYR-Motifs als Zielmolekül in der SELEX ist entscheidend.

4.2.3.3 Erstellung der Bibliothek 3 (RNA)

Bei der Bibliothek 3 handelt es sich um eine RNA-Bibliothek aus 102 Nucleotiden. Die ssDNA-Bibliothek enthält zwei äußere Primerregionen von 22 nt bzw. 20 nt Länge und einen Zufallsbereich von 60 nt. Die DNA-Matrize wurde von der Firma IBA in einem Synthesemaßstab von 1 μ mol synthetisiert (für die Sequenz siehe Anhang 9.1).

Für die präparative PCR wurden 3,2 nmol ($2,0 \cdot 10^{15}$ verschiedene Moleküle) der chemisch synthetisierten DNA eingesetzt, die in 14 Zyklen 6-fach amplifiziert werden konnte. Da es sich um eine RNA-Bibliothek handelt, wurde mit der PCR über den verlängerten Forward-Primer der T7-Promotor eingeführt. In der anschließenden präparativen T7-Transkription wurde ein Viertel der amplifizierten PCR-Produkte (5 nmol) verwendet, die 8-fach vermehrt wurden (40 nmol). Durch den anschließenden Reinigungsschritt über ein PAA-Gel ging ein Teil der RNA-Transkripte verloren, so dass nur 9,8 nmol RNA-Bibliothek vorlagen. Für die erste Selektionsrunde wurden davon 3,2 nmol (ungefähr $8,0 \cdot 10^{14}$ verschiedene Moleküle) eingesetzt. In den folgenden Runden wurde die für die Selektion eingesetzte Menge an RNA-Molekülen von 2,0 nmol auf 0,25 nmol verringert (siehe Material und Methoden, 3.2.7).

4.2.3.4 Optimierung der Selektionsbedingungen für SELEX 3

Für die SELEX 3 wurden Streptavidin beschichtete magnetische Partikel verwendet, um die biotinylierten Peptid-Targets über die Biotin-Streptavidin-Bindung zu immobilisieren. Der während der Selektion gebildete RNA-Peptid-Komplex ist an die magnetischen Partikel gebunden, während sich ungebundene RNA in Lösung befindet. Durch Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes konnte so effektiv gebundene RNA von freier RNA getrennt werden. Es wurde schon mehrfach die erfolgreiche Verwendung von magnetischen Partikeln für die SELEX in der Literatur beschrieben (Bruno und Kiel, 2002; Murphy *et al.*, 2003).

Um festzustellen, wie viel Peptid an eine bestimmte Menge magnetischer Partikel immobilisiert werden kann, wurde die Kapazität der magnetischen Partikel mit Hilfe der HPLC überprüft. Dazu wurde 1 nmol des jeweiligen Peptids mit 6,6 mg magnetischen Streptavidin-Partikeln für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Peptid sollte vollständig an die Partikel immobilisiert und im Überstand nicht mehr nachgewiesen werden. Die Messung der Überstände erfolgte jeweils über eine HPLC. Als Referenz wurde jeweils 1 nmol Peptid ebenfalls über die HPLC vermessen. Abbildung 4-13 zeigt das Diagramm der Auftrennung des Peptid 1. Das Diagramm für das zweite Peptid zeigt das gleiche Ergebnis (hier nicht dargestellt). Das Peptid 1 konnte nach einer Retentionszeit von etwa 12,9 min von der Säule gewaschen werden. Wurde der Peak für Peptid 1 an der entsprechenden Stelle integriert, konnte aus dem Quotienten des Flächeninhalts des Überstands zu Referenz die Kapazität der magnetischen Partikel berechnet werden. Für beide Peptide ergab sich eine Bindung von 96 %, d. h. 1 mg magnetische Partikel konnten ungefähr 140 pmol Peptid binden. Außerdem ist auf diese Weise nachgewiesen worden, dass mind. 96 % der Peptide wirklich biotinyliert sind und die Möglichkeit haben, immobilisiert zu werden.

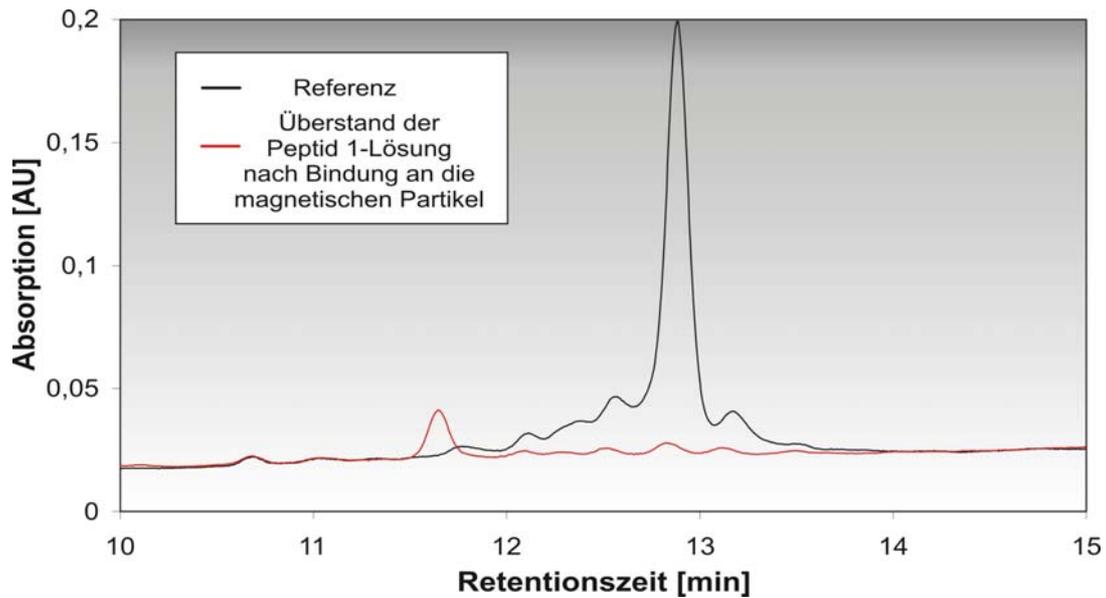


Abbildung 4-13: Bestimmung der Kapazität der magnetischen Partikel mit Hilfe der HPLC. **Schwarze Linie:** 1 nmol Peptid 1 (Referenz), **rote Linie:** Überstand nach Inkubation von 1 nmol Peptid 1 mit 6,6 mg magnetische Partikel für eine halbe Stunde bei RT. Es wurde eine *reverse-phase* Phenomenex Luna C8-Säule (10 μ m) in einem Hitachi LaChrom Gerät verwendet. Die Überstände wurden in 0,1 % Trifluoressigsäure (Lösung A) auf die Säule geladen und mit einem Acetonitril-Gradienten (Lösung B) von 5 - 100 % über eine halbe Stunde eluiert. (A: 100 % Wasser, 0,1 % TFA, B: 95 % Acetonitril, 5 % Wasser, 0,1 % TFA) Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgenommen. Die HPLC wurde von Christian Jäckel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Kokschi, FU Berlin durchgeführt.

Im Weiteren wurde die Stabilität der RNA-Bibliothek in Gegenwart der Peptide überprüft. Dazu erfolgte die Immobilisierung von 50 pmol Peptid 1 bzw. Peptid 2 auf den magnetischen Partikeln und eine Inkubation mit der radioaktiv markierten RNA-Bibliothek für 1 h. Gebundene RNA-Moleküle konnten isoliert und auf einem 10 % PAA-Gel sichtbar gemacht werden. Abbildung 4-14 zeigt, dass keine Abbauprodukte der RNA-Bibliothek nachgewiesen werden konnten. Die isolierte RNA nach der Selektion lief im Gel auf der gleichen Höhe wie die Kontrolle. Außerdem wurde nachgewiesen, dass gebundene RNA aus dem RNA-Target Komplex wieder gewonnen werden konnte.

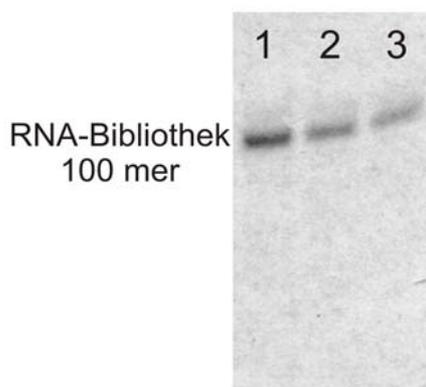


Abbildung 4-14: Einfluss der Versuchsbedingungen auf den Abbau der RNA Bibliothek. **1:** Kontrolle. **2:** Es wurden 50 pmol Peptid 1 auf den Streptavidin magnetischen Partikeln immobilisiert und mit 1 μ M einer radioaktiv markierten RNA-Bibliothek für 1 h inkubiert. Nicht gebundene RNA-Moleküle wurden entfernt und gebundene RNA-Moleküle mit 7 M Harnstofflösung abgetrennt und auf ein 10 % PAA-Gel aufgetragen. **3:** Der gleiche Versuch - wie unter 2 beschrieben - wurde mit Peptid 2 durchgeführt.

4.2.3.5 Durchführung der SELEX 3

Die Selektionen gegen die beiden Peptide wurden parallel und unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Bindungspuffer wurde der Selektionspuffer 3 (20 mM HEPES, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,01% (w/v) BSA) mit einer geringeren Konzentration an Mg²⁺-Ionen im Vergleich zu Selektionspuffer 2 verwendet. Durchgeführt wurden die Experimente in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 100 µl Volumen mit 0,4 mg magnetischen Partikeln. In allen Selektionsrunden wurde die RNA erst mit den magnetischen Partikeln und Biotin zusammengegeben, um unspezifische Binder an der Matrix zu entfernen. Danach wurde der reduzierte Pool mit dem jeweiligen immobilisierten Peptid in einem molarem Verhältnis von RNA : Peptid von 2 : 1 inkubiert. Es wurde ein relativ niedriges Verhältnis von RNA zu Peptid gewählt, um eine Bindung gerade in den Anfangsrunden zu forcieren. Bei einem niedrigen Verhältnis werden im Vergleich zu möglichen Bindern viele Bindungsstellen angeboten bei einer gleichzeitigen Minimierung des Konkurrenzverhaltens der RNA-Moleküle. Nach entsprechenden Waschschrinen wurde der RNA-Peptid Komplex mit 7 M Harnstofflösung denaturiert und gebundene RNA isoliert, die anschließend im Szintillationszähler vermessen wurde.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der SELEX 3. Die Tabelle stellt die Anteile der selektiv eluierten RNA nach Bindung an das Peptid 1 bzw. das Peptid 2 der einzelnen Selektionsrunden dar. Die Werte sind gemittelte Doppelbestimmungen. Ab Runde 7 wurde gegen das Peptid 2 nur noch ein Ansatz verwendet, weshalb hier keine Mittelwerte berechnet werden konnten. Außerdem sind die Anteile eluierter RNA nach Bindung an die Matrix für ausgewählte Selektionsrunden gezeigt.

Selektions- runde	Peptid 1		Peptid 2	
	eluierte RNA [%]	Kontrolle (ohne Peptid) [%]	eluierte RNA [%]	Kontrolle (ohne Peptid) [%]
1	0,3	0,1	0,3	0,1
2	0,2	0,1	0,3	0,1
3	0,4	0,2	0,8	0,2
4	0,3	0,2	0,4	0,2
5	0,3	0,2	0,2	0,2
6	0,4	0,2	0,2	0,2
7	2,1	0,3	0,4	0,4
8	5,8	0,4	0,4	0,3
9	7,4	0,7	4,2	2,7
10	7,0	2,9	3,3	3,3

In der ersten Selektionsrunde gegen das Peptid 1 konnten 0,35 % RNA von den magnetischen Partikeln eluiert werden. An die Matrix banden ungefähr 0,1 % der eingesetzten RNA-Bibliothek. In den folgenden Runden blieb der Anteil der eluierten RNA bei einem Wert von ungefähr 0,3 %. In der siebten Runde war für das Peptid 1 eine erste Anreicherung der

Bibliothek mit affinen Bindern zu beobachten. Bis zur neunten Runde stieg das Signal weiter auf 7,4 % an. Im zehnten Selektionszyklus konnten dagegen nur 7 % an Bindern eluiert werden, der Wert für die Kontrolle nahm jedoch um das Vierfache zu. Die Sättigung an spezifischen Bindern war erreicht; es kam zu keiner weiteren Zunahme der affinen Binder, sondern es addierten sich nur noch die unspezifischen Binder. Da der Anteil an gebundener RNA nicht mehr weiter zunahm, wurde die Selektion nach der zehnten Runde beendet.

An das Peptid 2 banden in der ersten Runde 0,26 % der eingesetzten RNA-Bibliothek. Einen Anstieg an Bindern konnte erst in der neunten Runde beobachtet werden, in der 4,2 % der RNA-Moleküle isoliert werden konnten. In der zehnten Runde wurde keine weitere Zunahme an gebundener RNA festgestellt. Allerdings erreichte der Anteil der eluierten RNA für die Kontrolle die gleiche Größe wie der Wert für die Bindung an Peptid 2, was auf unspezifische Bindung an die Matrix hinweist. Die Selektion gegen Peptid 2 wurde deshalb ebenfalls nach der zehnten Runde beendet.

Obwohl vor jeder Selektionsrunde eine Abtrennung von Matrix-affinen RNA Molekülen durchgeführt worden ist, nahm der Anteil an unspezifischen Bindern zu. Besonders stark ist dieser Effekt bei der Selektion gegen Peptid 2 zu sehen, in dem keine affinen Binder gegen das Peptid-Target, sondern gegen die Matrix selektiert worden sind. Tabelle 4-2 liefert detaillierte Angaben zu den einzelnen eluierten Mengen während der Selektion. In Abbildung 4-15 sind die Anteile der selektiv eluierten RNA je Selektionsrunde dargestellt.

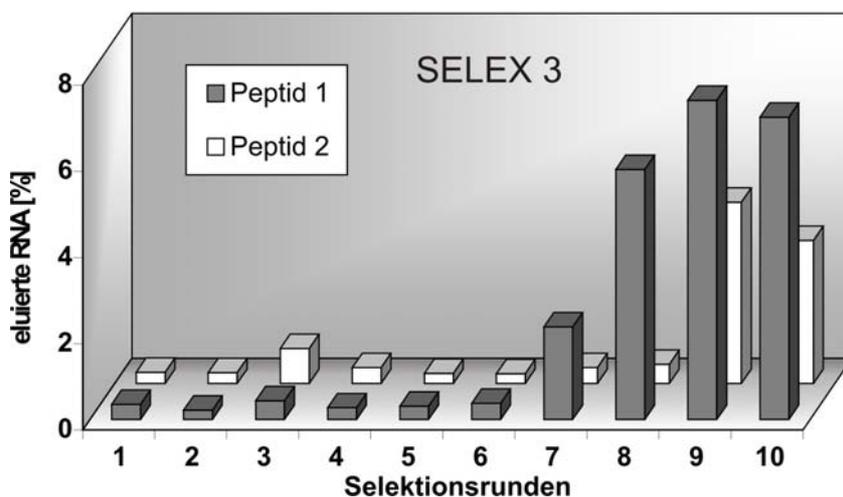


Abbildung 4-15: Anteil der selektiv eluierten RNA je Selektionsrunde der SELEX 3. Die grauen Balken zeigen den Anteil eluierter RNA gegen Peptid 1, die weißen Balken gegen Peptid 2. Die Werte wurden aus Doppelbestimmungen gemittelt.

4.2.3.6 Identifizierung von Peptid 1-spezifischen Aptameren mittels *Scintillation Proximity Assay* (SPA)

Die eluierte RNA aus der zehnten Runde der Selektion 3 gegen das Peptid 1 wurde revers transkribiert und mit der Taq-DNA-Polymerase in einer PCR amplifiziert. Die hier

verwendete Taq-DNA-Polymerase, besitzt eine Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die einen 3'-Überhang eines einzelnen Desoxyadenylats verursacht. Die Produkte wurden in den pGEM[®]-T Vektor ligiert. Die Klonierungsstrategie basiert auf der Ligation der 3'-T Überhänge des Vektors an der Insertionsstelle mit den Adenosinanhängen der PCR-Produkte.

Es wurden 168 Klone ausgesucht, davon waren 152 positiv, d. h. erfolgreich mit einem Insert ligiert worden. Von diesen positiven Klonen wurden 116 in einem qualitativen SPA-Bindungsassay (*Scintillation Proximity Assay*) auf Binder an das Peptid 1 getestet. Der Assay basiert auf der gesteuerten Auslösung des Szintillationssignals ausschließlich durch ein radioaktives Molekül mit kurzer Energiereichweite, das sich durch Bindung in unmittelbarer Umgebung des Szintillationspartikels befindet. Die Beads sind mit Streptavidin gekoppelt. Bindet Tritium-markiertes Biotin an Streptavidin bzw. ein Tritium-markiertes Aptamer an immobilisiertes Peptid, wird ein Signal ausgelöst, das mit dem Szintillationszähler gemessen werden kann.

Zuerst musste die Kapazität der SPA-Beads mit Hilfe von Tritium-markiertem Biotin bestimmt werden. Steigende Mengen von 0-130 pmol Biotin wurden mit jeweils 0,5 mg SPA-Beads für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Beads im Szintillationszähler vermessen, wobei die gemessenen Werte der gebundenen Menge an Biotin entsprachen. In Abbildung 4-16 sind die eingesetzten Mengen gegen die gebundene Menge an Biotin aufgetragen. Die Kurve wurde mit dem Programm SigmaPlot mit der Gleichung für einfach abgesättigte Bindungen (siehe Material und Methoden, Gleichung 3-3) an die Messpunkte angepasst. Aus der Funktion der Kurve kann der Wert für die Dissoziationskonstante abgelesen werden. Es wurde ein K_D -Wert von 27 ± 6 pmol bestimmt, d. h. die 0,5 mg SPA-Beads sind in der Lage, maximal 54 pmol Biotin oder Biotin-markierte Moleküle zu binden.

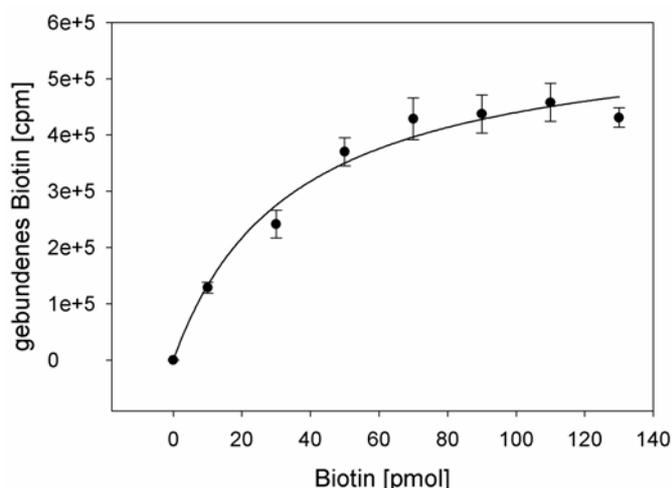


Abbildung 4-16: Kapazität der Streptavidin-SPA-Beads. Steigende Mengen von Tritium-markiertem Biotin (0-130 pmol) wurden jeweils mit 0,5 mg SPA-Beads für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Szintillationszähler vermessen. Die Menge an Biotin wurde gegen die gemessene Radioaktivität aufgetragen und die Kurve mit Hilfe des Programms SigmaPlot an die Messpunkte angepasst. Die Werte stammen jeweils aus Doppelbestimmungen.

Für den Bindungsassay wurde zunächst aus den Vektoren das inserierte Fragment amplifiziert, in RNA transkribiert und gleichzeitig mit Tritium markiert. Biotinyliertes Peptid 1 (20 pmol) wurden auf 0,4 mg der SPA-Beads immobilisiert. Dabei war darauf zu achten, dass die verwendete Menge an Peptid nicht im Sättigungsbereich der Partikel lag. Anschließend wurden je 20 pmol der Klone mit den behandelten SPA-Beads für eine halbe Stunde inkubiert und im Szintillationszähler vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen ausgeführt.

Für die Kontrolle wurde die unselektierte Ausgangsbibliothek verwendet. Wie erwartet konnte dafür nur eine sehr geringe unspezifische Bindung (61 cpm) festgestellt werden. Der Hintergrund der Messung lag bei ungefähr 30 cpm. Es wurden keine Binder gegen Streptavidin oder die Matrix identifiziert. Tabelle 4-3 gibt detailliert Auskunft über die Ergebnisse des Bindungsassays. Klone, die einen Wert größer als 280 cpm aufwiesen, wurden für weitere Studien ausgewählt und sind in der Tabelle 4-3 fett markiert.

4.2.3.7 Sequenzanalyse der SELEX 3

Die ausgewählten 42 Klone wurden anschließend von der Firma *Sequence Laboratories* Göttingen GmbH sequenziert. Außerdem erfolgte die Sequenzanalyse weiterer 21 Klone, die nicht in dem Bindungsassay getestet worden waren. Von den insgesamt 63 Klonen lagen viele Sequenzen in mehreren Kopien vor, so dass nur 19 verschiedenen Sequenzen gefunden werden konnten. In Tabelle 4-4 sind diese verschiedenen Klone und ihre Häufigkeit innerhalb des gesamten analysierten Pools aufgeführt. Die Klone wurden mit S3-x bezeichnet, wobei S3 für SELEX 3 und x für die entsprechende Klonnummer steht.

Einige der Sequenzen sind nahezu identisch und unterscheiden sich nur durch Punktmutationen. In Tabelle 4-4 sind diese ähnlichen Sequenzen in Gruppen zusammengefasst worden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Mutationen, die während der Amplifikation oder Transkription der *in vitro* Selektion aufgetreten sind. Die Länge der analysierten Sequenzen schwankte zwischen 100 und 102 Nucleotiden. Die ursprüngliche Länge der Bibliothek von 102 nt wurde wahrscheinlich ebenso durch die während der Selektion verwendeten DNA- und RNA-Polymerasen verändert. Im Folgenden werden diese Replikationsmutanten ausgeschlossen und für die weiteren Analysen nur noch die jeweils ersten Klone einer Gruppe (in Tabelle 4-4 fett unterlegt) als Repräsentanten verwendet.

Die ermittelten Sequenzen wurden auf gemeinsame Primärstruktur motive in dem ehemals randomisierten Bereich überprüft, um Aussagen über Bindungsmotive treffen zu können. Für den Vergleich der Sequenzen wurde das Programm *ClustalX* benutzt.

Tabelle 4-3: Ergebnisse des SPA-Bindungsassays. Die Bindung von je 20 pmol RNA der einzelnen Klone an 20 pmol an SPA-Beads immobilisiertes Peptid 1 wurde in Doppelbestimmungen gemessen. Der Hintergrund zeigt die gemessenen cpm-Werte für die SPA-Beads allein, für die Kontrolle wurde die unselektierte RNA-Bibliothek eingesetzt. Binder an das Peptid 1 wurden in der Tabelle fett markiert.

Klon (SELEX 3)	Bindung [cpm]	Klon (SELEX 3)	Bindung [cpm]	Klon (SELEX 3)	Bindung [cpm]
Kontrolle	61 ± 8	42	118 ± 8	83	45 ± 11
1	398 ± 6	43	186 ± 8	85	106 ± 4
2	375 ± 55	44	129 ± 34	86	426 ± 23
3	55 ± 11	45	366 ± 0	87	323 ± 10
4	287 ± 21	46	52 ± 2	88	374 ± 9
5	147 ± 22	47	333 ± 23	89	574 ± 80
6	72 ± 15	48	213 ± 21	90	111 ± 30
7	335 ± 13	50	64 ± 16	91	188 ± 30
8	71 ± 16	51	436 ± 2	92	197 ± 11
9	120 ± 2	52	58 ± 1	93	338 ± 18
10	300 ± 11	53	57 ± 8	94	56 ± 27
11	458 ± 48	54	62 ± 7	95	68 ± 11
12	94 ± 0	56	139 ± 6	96	337 ± 18
13	69 ± 9	57	93 ± 8	97	430 ± 32
14	65 ± 2	58	171 ± 13	98	378 ± 3
15	57 ± 1	59	323 ± 4	99	82 ± 13
16	304 ± 8	60	119 ± 18	100	228 ± 13
18	84 ± 1	61	162 ± 6	101	294 ± 10
19	91 ± 2	62	53 ± 18	102	188 ± 18
20	491 ± 7	63	436 ± 41	103	52 ± 4
21	80 ± 2	64	149 ± 3	104	198 ± 15
22	62 ± 6	65	95 ± 16	105	218 ± 2
23	431 ± 7	66	119 ± 13	106	176 ± 35
24	76 ± 15	67	410 ± 21	107	172 ± 12
25	311 ± 1	68	50 ± 0	108	225 ± 16
26	299 ± 28	69	505 ± 27	109	199 ± 21
27	59 ± 13	70	344 ± 54	110	312 ± 6
28	69 ± 4	71	153 ± 1	111	130 ± 5
29	210 ± 44	72	53 ± 1	112	468 ± 30
30	114 ± 30	73	51 ± 4	113	470 ± 31
31	280 ± 42	74	54 ± 9	114	79 ± 3
33	118 ± 6	75	305 ± 6	115	234 ± 9
34	72 ± 6	76	74 ± 7	116	61 ± 9
36	85 ± 10	77	368 ± 11	117	390 ± 33
37	89 ± 3	78	73 ± 10	118	384 ± 15
38	104 ± 18	79	408 ± 4	119	357 ± 6
39	99 ± 9	80	34 ± 1	120	248 ± 10
40	99 ± 1	81	314 ± 11	121	565 ± 42
41	105 ± 3	82	484 ± 30	122	314 ± 33

Die sieben verschiedenen Klone (Tab. 4-4) wurden sowohl in 2-er Paaren als auch alle sieben Sequenzen zusammen verglichen. Es stellte sich heraus, dass sich die Klone untereinander sehr stark ähnelten und viele übereinstimmende Bereiche gefunden werden konnten. Jedoch waren viele Homologien nur sehr kurz (drei oder vier Nucleotide), so dass die Häufigkeit ihres Auftretens in der statistischen Wahrscheinlichkeit lag. Es lässt sich daher vermuten, dass diese Bereiche kein konserviertes Bindungsmotiv bildeten. Viele der konservierten Motive konnten nur zwischen zwei oder drei Sequenzen beobachtet werden. Dabei wies eine ausgewählte Sequenz häufig nicht nur ein, sondern mehrere Motive auf. Besonders viele Gemeinsamkeiten konnten zwischen den Sequenzen S3-7, S3-20 und S3-10 sowie zwischen den Sequenzen S3-89 und S3-88 und den Sequenzen S3-63 und S3-131 bestimmt werden.

Tabelle 4-4: Überblick über die 19 verschiedenen gefundenen Sequenzen der SELEX 3 und ihre Häufigkeit. Sequenzen, die sich nur durch Punktmutationen unterscheiden, sind in Gruppen zusammengefasst, wobei jeweils die erste Sequenz einer Gruppe (fett unterlegt) für die weiteren Analysen verwendet worden ist.

Klon	Anzahl der Sequenzen	Häufigkeit der Sequenzen [%]
S3-89	23	36,5
S3-87	1	1,6
S3-51	1	1,6
S3-45	1	1,6
S3-143	1	1,6
S3-145	1	1,6
S3-163	1	1,6
S3-113	1	1,6
S3-118	1	1,6
S3-20	8	12,6
S3-77	1	1,6
S3-7	6	9,5
S3-123	3	4,8
S3-69	1	1,6
S3-59	6	9,5
S3-88	2	3,2
S3-70	1	1,6
S3-10	2	3,2
S3-131	2	3,2
19	63	100

Abbildung 4-17 verdeutlicht die verschiedenen gefundenen konservierten Motive (grau unterlegt) der einzelnen Sequenzen. Verschiedene Sequenzen können dabei häufiger auftreten. In der nachfolgenden Tabelle 4-5 sind die gefundenen Sequenzmotive aufgeführt, die nach ihrer Häufigkeit im gesamten analysierten Sequenzpool von 63 Klonen geordnet sind.

Auffällig ist das Motiv 3-1, das in fast allen Sequenzen zu finden war. Diese Motivsequenz ist allerdings komplementär zu einem Bereich innerhalb der Forward-Primer-Bindungsstelle, die in allen Sequenzen vorhanden ist. Da RNA-Moleküle eine hohe strukturelle Stabilität anstreben, ist es wahrscheinlich, dass Primerregionen in die Sekundärstruktur mit einbezogen werden. Dieses Motiv kann deshalb auch in Sequenzen auftreten, die sonst nicht strukturell verwandt sind und bildet wahrscheinlich kein Bindungsmotiv. Ebenso verhält es sich mit dem Motiv 3-5, das auch komplementär zum Forward-Primer ist. Die Motive 3-2 und 3-3 treten auch sehr häufig auf, wobei in Motiv 3-2 eine sehr lange Sequenz mit 14 Nucleotiden konserviert ist. Die Häufigkeit und Länge der Motive deutet auf eine Funktion bei der Bindung an das Peptid 1 hin.

Tabelle 4-5: Häufigkeit und Vorkommen der konservierten Primärstrukturmotive der SELEX 3. Die konservierten Sequenzen (in Klammern die Anzahl der Nucleotide) sind nach ihrer Häufigkeit im gesamten untersuchten Sequenzpool (63 Klone) sortiert. (**Y** = C oder T, **R** = A oder G, **S** = G oder C, **W** = T oder A, **M** = C oder A, **K** = G oder T, **X** = *gap* oder N, **N** = A, C, G oder T)

Motiv Nr.	konservierte Basenabfolge	verschiedene Sequenzen	Sequenzen insgesamt	Häufigkeit der Sequenzen [%]
3-1	YG CXGGTW (8)	S3-7, S3-10, S3-20, S3-69, S3-89	56	89
3-2	CRCGMTXTTCGCYC (14)	S3-7, S3-69, S3-89	47	75
3-3	TTCCCT (6)	S3-20, S3-88, S3-89	43	68
3-4	YTGCYGYGG (9)	S3-88, S3-89	34	54
3-5	GTTCGXCCCXGRYGCR (16)	S3-88, S3-89	34	54
3-6	GTGTGYCAAC (10)	S3-7, S3-10	11	18
3-7	CTAAGTG (7)	S3-69, S3-88	10	16
3-8	CGXCGTXATGXGGCCGT (17)	S3-69, S3-131	9	14

Näheren Aufschluss über mögliche Bindungsmotive ergibt erst eine Kombination aus Primär- und Sekundärstrukturanalyse. Deshalb wurden Sekundärstruktur-Vorhersagen mit dem Programm *RNA-FOLD*, dem der Zuker-Algorithmus zugrunde liegt (Zuker, 1989), durchgeführt. In Abbildung 4-18 und 4-19 sind die potenziellen Sekundärstrukturen der einzelnen Klone dargestellt. Für die Vorhersagen wurde jeweils die gesamte Aptamersequenz,

also auch die Primerregionen, die in den Bereichen von 1-22 nt und 82-102 nt lagen, verwendet. Die Primerregionen waren während der gesamten *in vitro* Selektion und den anschließenden Bindungsstudien anwesend und sind somit wichtig für die Sekundärstruktur der Aptamere. Teilweise wurden für eine Sequenz mehrere Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen Energien ermittelt, von denen jeweils nur die stabilste Struktur abgebildet wurde. Für die meisten Sequenzen ergaben sich außerdem nur sehr geringe Abweichungen in den verschiedenen gefundenen Sekundärstrukturen, die sich im Wesentlichen auf die Primerregionen bezogen.

Die Strukturen der Aptamere S3-7, S3-10, S3-69 und S3-89 sind sich - wie die Primärstrukturanalyse schon vermuten ließ - sehr ähnlich (Abb. 4-18). Das Grundgerüst scheint aus einem inneren Loop aus 10-14 Nucleotiden zu bestehen, von dem ein kurzer und zwei längere helicale Bereiche abzweigen, die in einem Loop enden. Die langen Helices können von weiteren inneren Loops oder Bulges unterbrochen sein. Das konservierte Sequenzmotiv 3-2 bildet in den drei Aptameren S3-7, S3-69 und S3-89 das gleiche strukturelle Muster. Die ersten drei Nucleotide sind in einem Teil des doppelsträngigen Bereichs des kürzesten Stemloop-Motivs zu finden, die folgenden drei Nucleotide liegen ungepaart vor und die restlichen Nucleotide des Motivs bilden Basenpaare mit dem Forward-Primer. Die ungepaarten Nucleotide bestehen aus der konservierten Sequenz GCU bzw. GAU und befinden sich in dem zentralen inneren Loop des Aptamers. Weiterhin liegt in diesem Loop die Sequenz UUGG, die aus dem Forward-Primer stammt, einzelsträngig konserviert vor. Die ungepaarten Nucleotide in dem inneren Loop bilden wahrscheinlich ein konserviertes Bindungsmotiv, das durch die umgebenden Helices stabilisiert wird. Die Aptamere S3-7 und S3-69 zeigten in Bindungsstudien (siehe 4.2.3.9) eine hohe Affinität für das Peptid-Target. S3-89 weist dagegen eine um den Faktor 6 schwächere Affinität auf. In Aptamer S3-89 liegt allerdings das erste U-Nucleotid der Sequenz UUGG gepaart vor, so dass das Bindungsmotiv nur eingeschränkt ausgebildet wird und somit eine schwächere Bindung an das Peptid 1 erklärt werden kann. Der Reverse-Primer liegt mit sich selber gepaart vor. Durch Abtrennung dieser Primersequenz liegt das Bindungsmotiv noch intakt vor, so dass die Aptamere wahrscheinlich um diesen Bereich verkürzt werden können.

Obwohl die Struktur des Aptamers S3-10 sehr ähnlich zu den vorher beschriebenen Aptameren ist, konnte kein identisches Bindungsmotiv zu Motiv 3-2 entdeckt werden. Die Aptamere S3-10 und S3-7 besitzen aber gemeinsam das Motiv 3-6, das den äußeren Loop der Struktur bildet. Da dieses Strukturmotiv hoch konserviert vorliegt, scheint es ein weiteres Bindungsmotiv zu bilden.

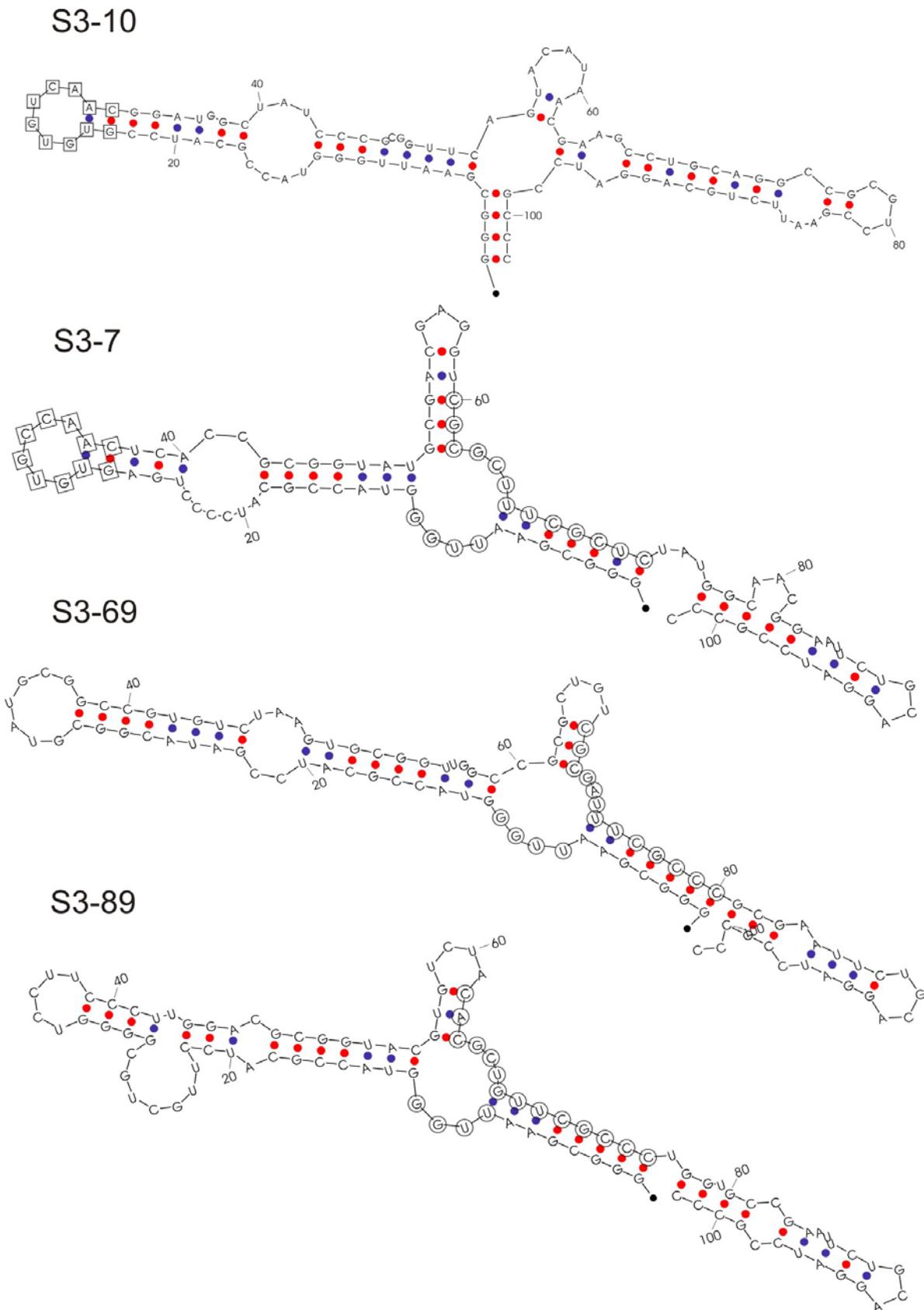


Abbildung 4-18: Sekundärstrukturmodelle der Aptamere S3-10, S3-7, S3-69 und S3-89. Motiv 3-2 ist mit Kreisen, Motiv 3-6 mit Quadraten gekennzeichnet. Starke Basenpaare (G-C) wurden mit roten Kreisen, schwache Basenpaare (A-T oder Wobble-Basenpaarung) mit blauen Kreisen markiert.

Die hohe Affinität des Aptamers S3-7 für das Peptid 1 kann mit der Ausbildung beider Bindungsmotive erklärt werden. Das Aptamer S3-10 enthält nur eines der beiden Bindungsmotive und seine Affinität ist deshalb wahrscheinlich geringer und liegt im Bereich des Aptamers S3-89.

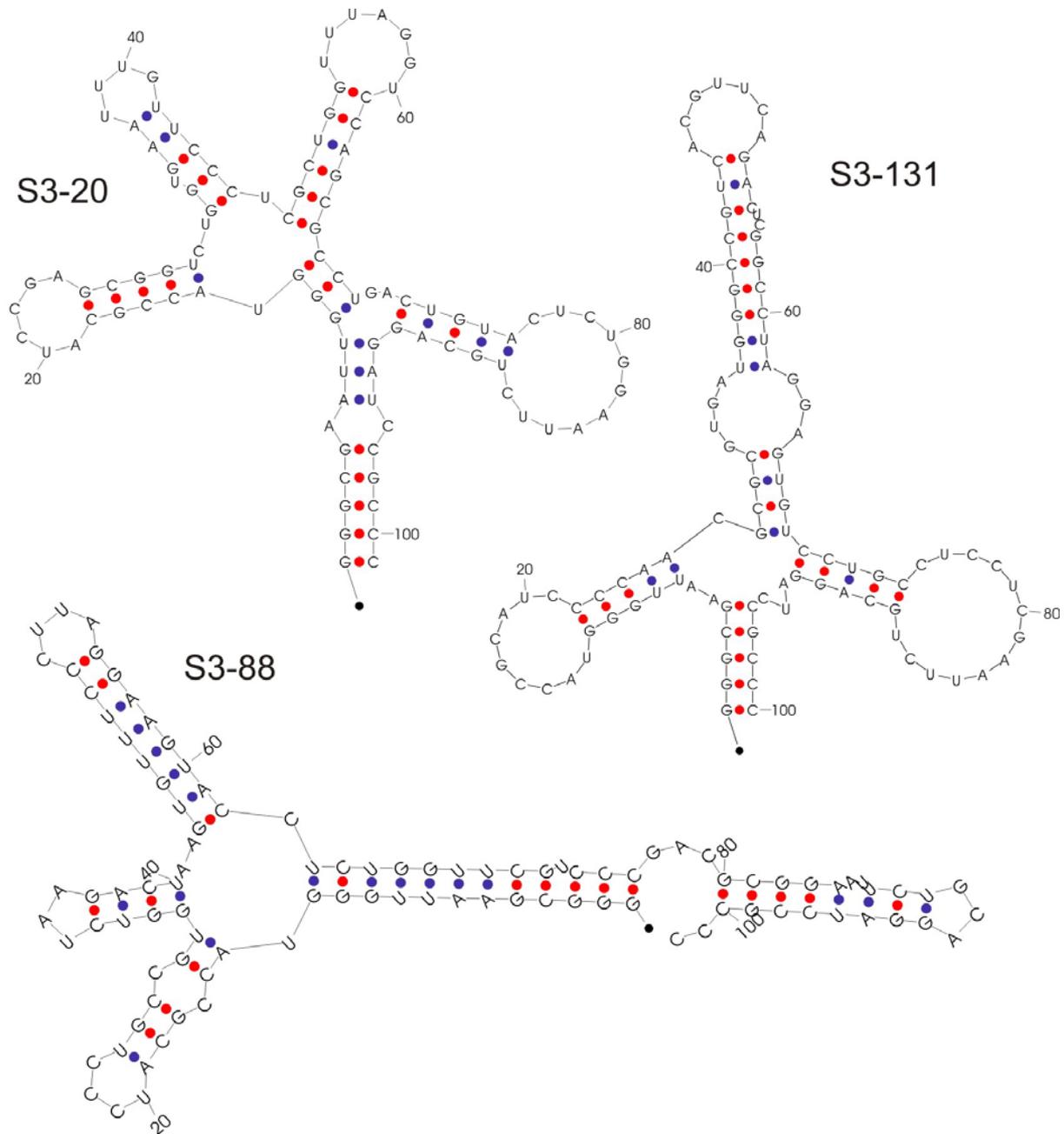


Abbildung 4-19: Sekundärstrukturmodelle der Aptamere S3-20, S3-88 und S3-131. Starke Basenpaare (G-C) wurden mit roten Kreisen, schwache Basenpaare (A-T oder Wobble-Basenpaarung) mit blauen Kreisen markiert.

Die Aptamere S3-69 und S3-131 bzw. S3-88 und S3-89 gleichen sich in ihrer Primärstruktur sehr stark (Abb. 4-17). Interessanterweise zeigen ihre entsprechenden Sekundärstrukturen große Unterschiede zueinander auf (Abb. 4-18 und 4-19). Während bei dem Aptamer S3-69 das Motiv 3-8 (C27-U42) ein Stemloop-Motiv bildet, liegt es in Klon S3-131

(C29-C44) in einem Helixbereich, der durch einen aus 11 Nucleotiden bestehenden inneren Loop unterbrochen wird.

Die Nucleotide, die den einzelsträngigen Abschnitt bilden, sind fast identisch, aber ein gemeinsames Bindungsmotiv wird diese Sequenz wahrscheinlich nicht bilden, da die Unterschiede in der Sekundärstruktur zu groß sind. Trotzdem könnte der innere Loop in Aptamer S3-131 in die Bindung an das Peptid 1 involviert sein.

Die Struktur des Aptamers S3-88 besteht aus einem langen helicalen Bereich, der in einem inneren Loop endet. Von diesem Loop gehen drei Hairpin-Motive aus. Das Motiv 3-4 (U24-U34) befindet sich auf zwei Hairpin-Motive verteilt, wobei bis auf eine Fehlpaarung alle Nucleotide gepaart vorliegen. In Aptamer S3-89 (U23-G31) bildet das gleiche Motiv einen Bulge aus. Die Nucleotide liegen also bei diesem Aptamer einzelsträngig vor. Da dieses Sequenzmotiv nicht in der Sekundärstruktur konserviert ist, scheint es kein gemeinsames Bindungsmotiv für die Aptamere S3-88 und S3-89 zu bilden. Genauso verhält es sich mit dem Motiv 3-7, das in der Primärstruktur von Aptamer S3-69 und S3-88 konserviert vorliegt, aber nicht in der Sekundärstruktur, bzw. mit dem Motiv 3-3 bei den Aptameren S3-20, S3-88 und S3-89.

Die Struktur des Aptamers S3-20 wurde sowohl mit der Software *RNA-FOLD*, als auch durch enzymatische Sekundärstrukturanalyse bestimmt (siehe 4.2.3.8 und Abb. 4-19). Von einem inneren Loop gehen drei Hairpin-Strukturen und eine kurze Helix aus, die sich in einen weiteren Hairpin und in eine helicale Struktur teilt. Alle gefundenen Sequenzmotive in der Primärstruktur konnten keinen konservierten Strukturmotiven zugeordnet werden.

Da für die Aptamere S3-20, S3-88 und S3-131 keine Bindungsmotive aus der Sekundärstruktur ermittelt werden konnten, besitzt wahrscheinlich jedes dieser Aptamere ein eigenes Bindungsmotiv, das experimentell, z.B. durch Verkürzungsstudien, näher bestimmt werden kann. Eine Gemeinsamkeit der drei Aptamere ist, dass ein Teil des Forward-Primers jeweils in dem ersten Hairpin mit der Aptamersequenz gepaart vorliegt und der Reverse-Primer entweder mit sich selbst oder mit dem Forward-Primer eine Helix bildet. Der Reverse-Primer wird wahrscheinlich auch hier keinen Einfluss auf die Stabilität oder das Bindungsmotiv des Aptamers haben, was vermuten lässt, dass die Aptamersequenz um diesen Teil gekürzt werden kann.

4.2.3.8 Charakterisierung des Klons S3-20

Klon S3-20 stellte sich als einer der besten Binder heraus, weshalb diese Sequenz näher charakterisiert wurde. Die vorhergesagte Faltung der Sequenz konnte durch weitergehende

enzymatische Spaltungsexperimente analysiert werden. Das Aptamer musste dafür jeweils am 3'- und am 5'-Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert und nach der korrekten Faltung mit verschiedenen, spezifisch spaltenden Nucleasen zu etwa 50 % verdaut werden, so dass statistisch nur eine Spaltung pro Molekül erfolgte. Verwendet wurden die Einzelstrang- und Guanosin-spezifische RNase T1, die einzelstrangspezifische Nuclease S1, die einzelstrang- und pyrimidinspezifische RNase A und die doppelstrangspezifische RNase V1. Unter Verwendung einer Alkalileiter und dem Spaltungsmuster der RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen als internen Marker konnten die Spaltungsprodukte in einem denaturierenden Gel den entsprechenden Nucleotiden der Sequenz zugeordnet werden (Abb. 4-20).

Bei der 3'-Markierung konnten trotz mehrfacher Wiederholung und Reinigung der markierten RNA über ein 20 %-iges Gel nicht das Oligonucleotid der Länge n von dem Oligonucleotid $(n + 1)$ abgetrennt werden, so dass bei dem Verdau Doppelbanden beobachtet wurden. Trotzdem konnte das Spaltungsmuster zur Auswertung herangezogen werden. Durch den enzymatischen Verdau konnte die Sekundärstrukturvorhersage bestätigt und im Bereich der Primer verfeinert werden (Abb. 4-19, S3-20).

In den Abschnitten von A14-G17/G25-U29, G32-G33/U43-C45, C48-G52/C62-G65 und C72-A76/G91-92 konnten eindeutig doppelsträngige Bereiche nachgewiesen werden. Diese Regionen wurden von der RNase V1 spezifisch gespalten. Einige Nucleotide wurden sowohl von den einzelstrang- als auch von doppelstrangspezifischen Ribonucleasen gespalten (z.B. G11, U30, G70 oder G74). Diese Sensitivität der Nucleotide weist auf flexible Bereiche am Anfang und am Ende der Doppelstränge hin.

Über die Bereiche < 10 und > 77 Nucleotide konnten keine Aussagen aus der Gelanalyse getroffen werden. Jedoch ergibt sich aus den Aussagen der enzymatischen Strukturanalyse der anderen Bereiche zwangsläufig eine eindeutige Sekundärstruktur für die gesamte Sequenz. Aus den Spaltungsmustern der einzelstrangspezifischen RNasen konnten stark ausgeprägte Banden bei U40/G41 und G58 festgestellt werden, die sich in stark konservierten Loop-Bereichen befinden. Die Loop-Regionen bei A19-A24 und C77-C87, sowie das einzelsträngig vorliegende Nucleotid U13 konnten durch den RNase-Verdau ebenso bestätigt werden. Schwache Bandenmuster weisen auf eine schlechte Zugänglichkeit der Nucleotide in der Struktur hin, so dass diese Bereiche gar nicht oder nur schwierig gespalten werden können.

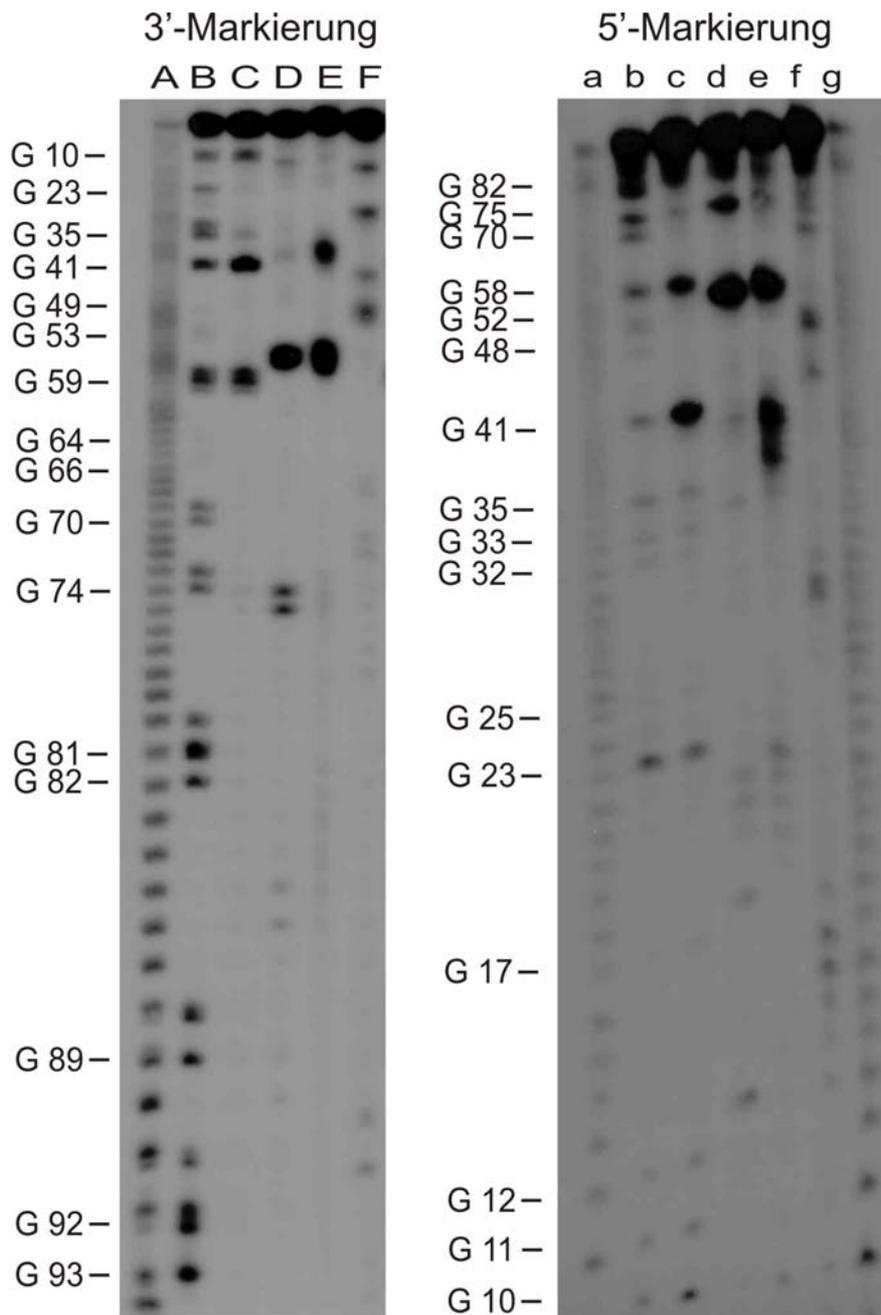


Abbildung 4-20: Enzymatische Strukturanalyse des Aptamers S3-20. In den Spuren A-F wurde das 3'-markierte Aptamer und in den Spuren a-g das 5'-markierte Aptamer analysiert. Die Spuren **A, a und g** zeigen die Alkalileiter, die Spuren **B und b** den Verdau mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen (Marker), die Spuren **C und c** der native Verdau mit RNase T1, die Spuren **D und d** die Spaltung mit RNase A (nativ), die Spuren **E und e** den Abbau mit der Nuclease S1 (nativ) und die Spuren **F und f** die RNase V1-Spaltung (nativ). Die G-Nucleotide sind mit den entsprechenden Zahlen in der Sequenz nummeriert.

Um die Bindungsdomäne des Aptamers S3-20 einzuschränken, wurde die Sequenz mittels PCR mit geeigneten Primern zu den Konstrukten S3-20_V1 (61-mer) und S3-20_V2 (53-mer) verkürzt (für die Sequenzen siehe Anhang 9.1.6). Mit Hilfe des SPA-Bindungsassays wurden die Affinitäten der Oligonucleotide zum Peptid 1 untersucht (Abb. 4-21). Die verkürzten

Aptamere wiesen dabei innerhalb der Fehlergrenzen ungefähr die gleiche oder sogar eine bessere Bindungsaffinität zu dem Zielmolekül auf. Bei der Vorhersage der Sekundärstruktur wurde jeweils nur eine Faltungsmöglichkeit durch das Programm *RNA-FOLD* gefunden, was auf stark konservierte und stabile Strukturen hindeutet. Die beiden mittleren Hairpin-loops (G32-C46 und C48-G66) des gesamten Aptamers S3-20 sind dabei in hohem Maße konserviert. Diese Struktur motive sind in die Bindung involviert; die Doppelhelix im Bereich der Enden dient wahrscheinlich nur zur Stabilisierung für die Bindungstasche. Dabei ist die Länge der Helix entscheidend. In Variante S3-20_V1 ist der helicale Bereich 10 Basenpaare lang, in S3-20_V2 nur 7 Basenpaare. Die Verkürzung der Helix führt zu einer reduzierten Bindungsaffinität zum Zielmolekül. Wie schon vermutet, sind der Primer-gepaarte Hairpin-loop und der Reverse-Primer nicht essentiell für die Bindung.

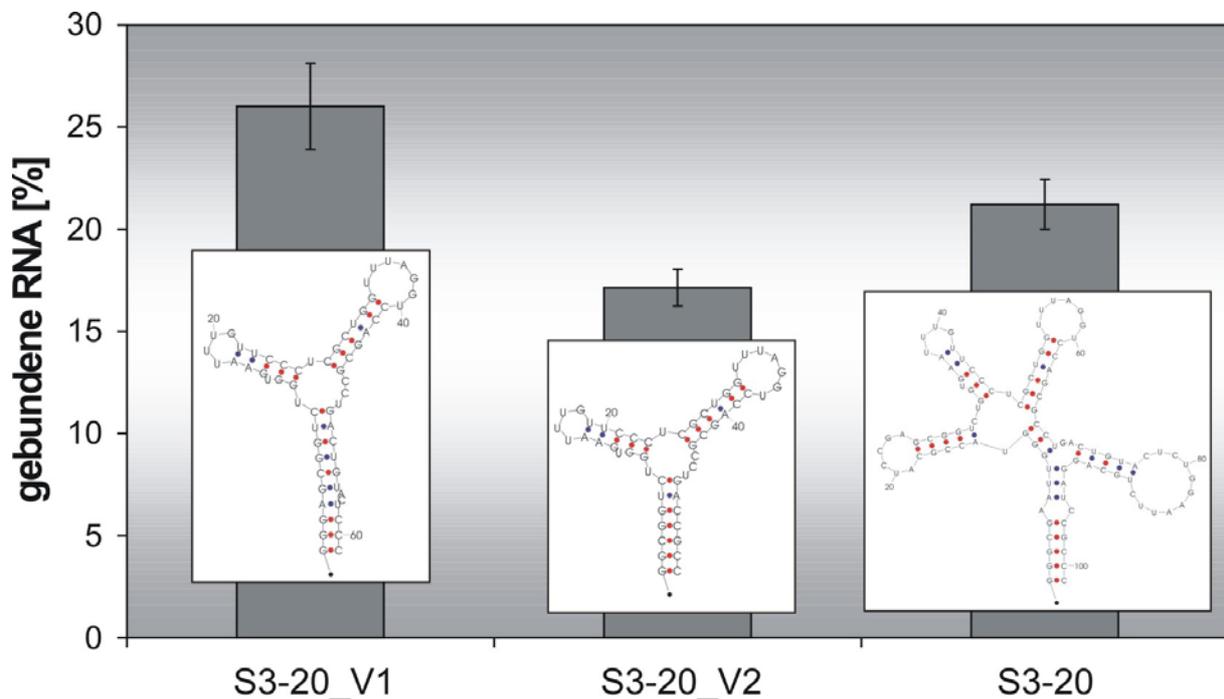


Abbildung 4-21: Bindungseigenschaften der verkürzten Varianten S3-20_V1 und S3-20_V2 im Vergleich zum Aptamer S3-20 mit dazugehörigen Sekundärstrukturvorhersagen. Die Oligonucleotide wurden im SPA-Bindungsassay auf ihre Affinität gegenüber dem Peptid 1 getestet. Die Vierfach-Bestimmungen wurden gemittelt und die Standardabweichung eingezeichnet.

4.2.3.9 Bestimmung der Dissoziationskonstante der Aptamere aus SELEX 3 an Peptid 1

Um die Aptamerbindung an das Peptid 1 zu charakterisieren, wurden die Dissoziationskonstanten der selektierten Aptamere mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonenresonanz Spektroskopie (SPR) unter Verwendung eines BIACORE-Gerätes und eines Streptavidin-Sensorchips bestimmt. Das biotinylierte Peptid 1 wurde auf dem Sensorchip über die Bindung an Streptavidin immobilisiert. Die Beladung des Chips mit dem

Peptid führte zu einer Erhöhung des Signals um ungefähr 450 RU. War das Peptid immobilisiert, blieb die Basislinie konstant und der Chip konnte für etwa 20-30 Messungen verwendet werden.

Zu dem immobilisierten Peptid wurden verschiedene Konzentrationen (5-400 nM, 6-8 Messungen) der jeweiligen Aptamere innerhalb von 12 min bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Die Assoziation an das Peptid konnte durch den Anstieg des Messsignals (RU) und die Dissoziation nach erfolgreicher Injektion durch den Abfall der RU-Werte verfolgt werden. Der Signalanstieg erreichte Werte zwischen 10-300 RU. Von den gemessenen Kurven wurde die Kurve nach Pufferzugabe abgezogen. Abbildung 4-22 zeigt das Ergebnis einer Messreihe anhand des Klons S3-89.

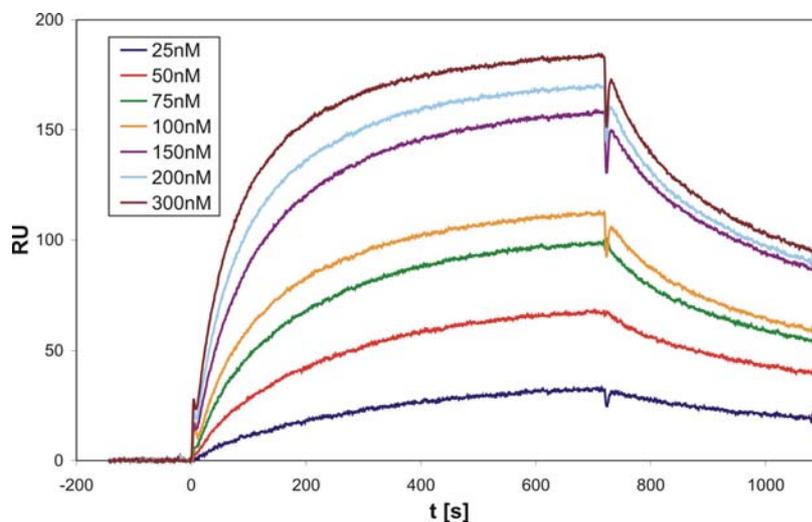


Abbildung 4-22: BIACORE Messkurven am Beispiel des Aptamers S3-89. Die eingezeichneten Konzentrationen des Aptamers wurden zu dem auf dem Sensorchip immobilisierten Peptid 1 injiziert und die Massenzunahme anhand des ansteigenden RU-Wertes detektiert. Nach der Injektion bei 0 s und der Assoziationskurve folgte die Dissoziationskurve.

Zur Auswertung der Messkurven musste eine Sättigung der Bindung erreicht werden, um das Gleichgewicht, bei dem sich Assoziation und Dissoziation entsprechen, zu gewährleisten. Außerdem musste mindestens eine eingesetzte Konzentration oberhalb des K_D -Wertes liegen. Die erreichten maximalen RU-Werte im Gleichgewichtszustand wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Die Sättigungskurve wurde mit Gleichung 3-3 an die Messwerte angepasst und die Dissoziationskonstante aus der Gleichung abgelesen. Die Abbildung 4-23 gibt die Auswertung der BIACORE-Messkurven für die einzelnen Aptamere wieder und in Tabelle 4-6 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Für alle gemessenen Aptamere wurden Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich gemessen, wobei Klon S3-7 und S3-20 die besten Binder mit einem Wert von 22 nM bzw. von 19 nM sind. Es konnten also erfolgreich hochaffine Aptamere gegen das Peptid 1, das ein konformationsspezifisches Epitop für die pathogene Form des Prionproteins darstellt, selektiert werden.

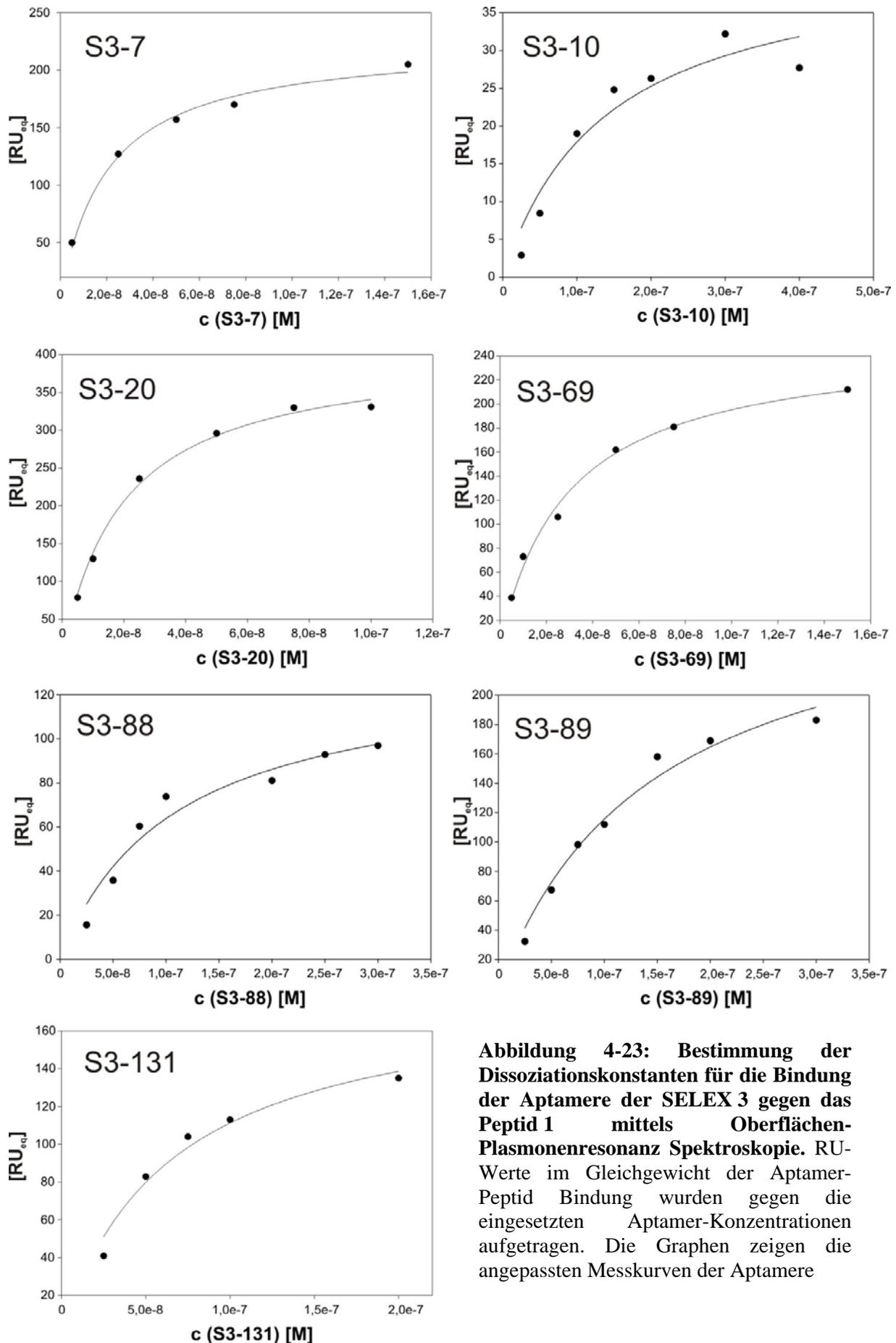


Abbildung 4-23: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Bindung der Aptamere der SELEX 3 gegen das Peptid 1 mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz Spektroskopie. RU-Werte im Gleichgewicht der Aptamer-Peptid Bindung wurden gegen die eingesetzten Aptamer-Konzentrationen aufgetragen. Die Graphen zeigen die angepassten Messkurven der Aptamere

Klon	K_D [nM]
S3-7	22 (\pm 9)
S3-10	141 (\pm 65)
S3-20	19 (\pm 3)
S3-69	29 (\pm 5)
S3-88	108 (\pm 36)
S3-89	148 (\pm 33)
S3-131	65 (\pm 18)

Tabelle 4-6: Übersicht über die Dissoziationskonstanten der einzelnen Aptamere gegen Peptid 1.

4.2.3.10 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante der Aptamere aus SELEX 3 an monomeres bzw. oligomeres Prionprotein

Nach der Strategie der SELEX 3 (siehe 4.2.3.1) sollten Aptamere, die eine hohe Affinität für das konformationsspezifische Epitop (Peptid 1) aufweisen, auch an die pathogene, aber nicht an die zelluläre Form des Prionproteins selektiv binden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die apparenten Bindungskonstanten der Bindung der Aptamere der SELEX 3 an ein *in vitro* aggregiertes Oligomer O1 (zur näheren Beschreibung siehe 4.2.4.2) bzw. an das rekombinant überexprimierte monomere PrP^C (23-231) bestimmt.

Die Bindung eines Aptamers an sein Zielmolekül kann als Gleichgewichtszustand zwischen den frei vorliegenden Komponenten und dem Aptamer-Target Komplex betrachtet werden. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante nach der allgemeinen Bindungsgleichung 3-9 müssen die Konzentrationen des Aptamers, des Targets und des gebildeten Komplexes im Gleichgewicht ermittelt werden. Bei bekannten RNA- und Target-Konzentrationen konnte der Aptamer-Target Komplex mit Hilfe von *Strataclean*TM resin von ungebundener RNA abgetrennt und so die Komplex-Konzentration im Gleichgewicht bestimmt werden. Dabei wurde die Konzentration der jeweiligen radioaktiv markierten RNA konstant bei 0,1 μ M gehalten und die RNA mit verschiedenen Konzentrationen der Prionproteine inkubiert. Eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten ist möglich, wenn der Parameter (Prionprotein) in seiner Konzentration variiert wird, der nicht auch Messparameter (radioaktive RNA) ist. Die ermittelte Konzentration des Aptamer-Target Komplexes im Gleichgewicht wurde daher gegen die eingesetzten Konzentrationen des Targets in einem Diagramm aufgetragen und eine Kurve nach Gleichung 3-9 (siehe Material und Methoden 3.2.8.3) angepasst (Abb. 4-24). Die Dissoziationskonstante konnte aus der Gleichung bestimmt werden. In der sigmoidalen Kurve entspricht der K_D -Wert dem Abszissenwert im Wendepunkt, wenn genau 50 % der Bindung erreicht sind. Tabelle 4-7 gibt einen Überblick über die gemessenen Dissoziationskonstanten. In Vorversuchen, in denen ein Filterbindungsassay verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass die Aptamere nicht an

BSA oder den Filter, nur wenig an das monomere PrP^C und sehr gut an das Oligomer O1 banden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante bestätigte diese Ergebnisse.

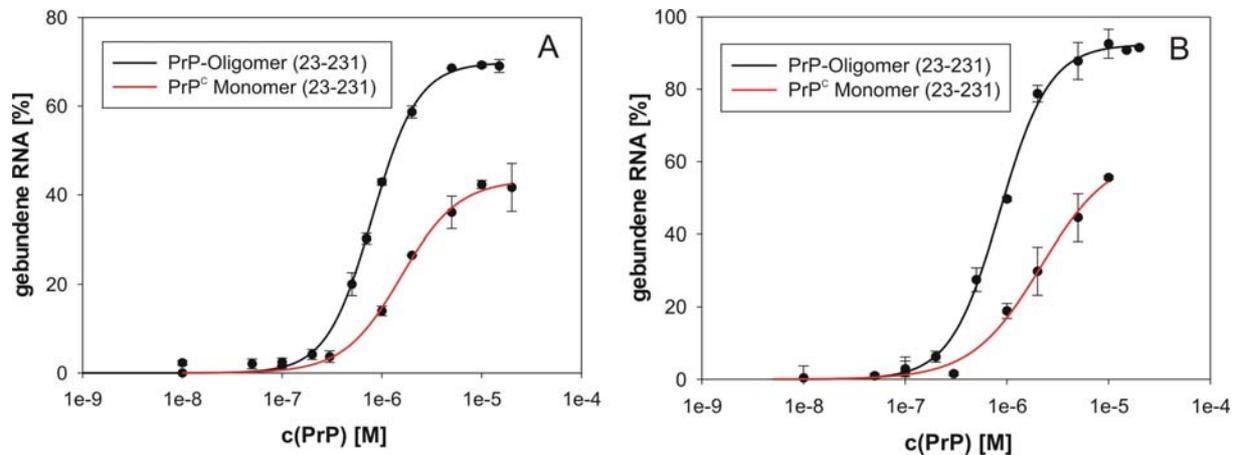


Abbildung 4-24: Bindungskurven der RNA gegen das oligomere (schwarze Kurve) bzw. monomere (rote Kurve) Prionprotein. Verschiedene Konzentrationen der Prionproteine (0-5 μM) wurden mit 0,1 μM der jeweiligen radioaktiv markierten RNA inkubiert und gebildete Komplexe mit *Strataclean*TM resin abgetrennt. **A:** Aptamer S3-20, **B:** unselektierte Bibliothek als Kontrolle.

Die Aptamere weisen einen K_D -Wert (PrP-Oligomer) im oberen nanomolaren Bereich auf und besitzen eine doppelt so hohe Affinität zu den Aggregaten als zum Monomer PrP^C. Jedoch stellte sich heraus, dass die unselektierte Bibliothek, die als Kontrolle eingesetzt wurde, die gleichen Dissoziationskonstanten wie die selektierten Aptamere aufwies. Das Prionprotein scheint generell eine hohe Affinität gegenüber Nucleinsäuren unterschiedlicher Sequenzen aufzuweisen. Die hochaffinen Aptamere gegen das konformationsspezifische Epitop „YYRRYYRYY“, das durch Peptid 1 dargestellt wird, erzielten keine stärkere Bindung an das Prionprotein als die unselektierten RNA-Moleküle der Ausgangsbibliothek. Dieses Epitop wird anscheinend nicht von den selektierten Aptameren in den Oligomeren, die als Modell für die pathogene Form des Prionproteins verwendet wurden, erkannt, so dass es zu keiner spezifischen Bindung an das Oligomer kommen kann.

Tabelle 4-7: Apparente Dissoziationskonstanten der Bindung von RNA an das oligomere bzw. monomere Prionprotein.

RNA	K_D (PrP-Oligomer) [μM]	K_D (PrP ^C Monomer) [μM]
S3-20	0,80 (\pm 0,02)	1,6 (\pm 0,1)
unselektierte Bibliothek	0,85 (\pm 0,03)	2,2 (\pm 0,5)

Als Kontrolle für den *Strataclean*TM Assay wurde ein ELISA durchgeführt, um nachzuweisen, dass ohne die *Strataclean*TM resins keine Präzipitation der Proteine oder der RNA-Protein

Komplexe bei der Zentrifugation erfolgte. Dazu wurden jeweils Protein (1 μM) mit bzw. ohne RNA (1 μM) inkubiert, zentrifugiert und der Überstand in Verdünnungsreihen auf die ELISA-Platte aufgetragen. Mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4 und dem entsprechenden zweiten Antikörpern konnte das Prionprotein quantitativ nachgewiesen werden (Abb. 4-25). Weder das Oligomer noch das monomere PrP^C wurden während der Zentrifugation pelletiert. Die Inkubation des Oligomers sowohl mit dem Aptamer S3-20 als auch mit der unselektierten RNA-Bibliothek hatte auch keinen Einfluss auf das Verhalten während der Zentrifugation. Überraschenderweise wurde jedoch ungefähr die Hälfte der monomeren PrP^C-Moleküle nach Zugabe der RNA durch die Zentrifugation pelletiert, so dass sich die Menge im Überstand verminderte. Die RNA-Moleküle scheinen einen Einfluss auf PrP^C auszuüben, der das Protein veranlasst zu aggregieren, so dass die entstehenden Aggregate pelletiert werden konnten. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden CD-Spektroskopie und DLS-Messungen durchgeführt (siehe 4.3).

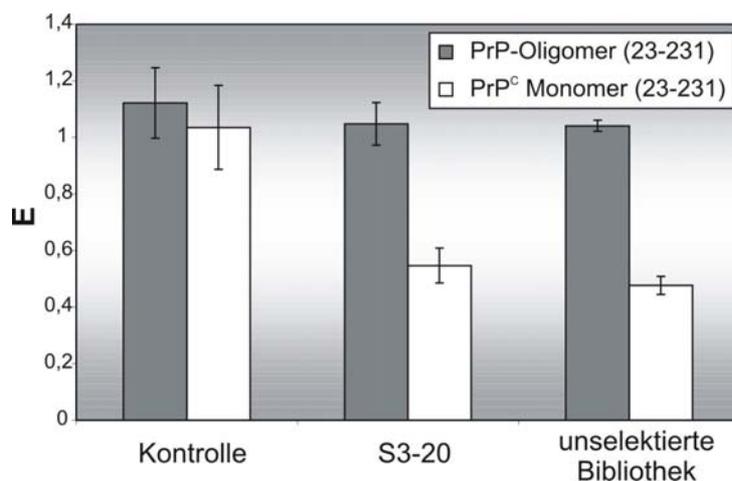


Abbildung 4-25: Ergebnisse des ELISA zur Untersuchung des Präzipitationsvermögens von oligomeren bzw. monomeren Prionprotein. Protein (1 μM) wurden mit bzw. ohne RNA (1 μM) inkubiert und anschließend zentrifugiert. Ein Zehntel des Überstands nach der Zentrifugation wurde auf die ELISA-Platte aufgetragen und mittels Antikörper detektiert und vermessen.

4.2.4 SELEX 4 gegen *in vitro* aggregierte PrP-Oligomere O1

4.2.4.1 Auswahl des Targets

Während des Fortschreitens dieser Arbeit setzte sich in der Literatur die Annahme durch, dass Infektiösität und Toxizität nicht notwendigerweise gekoppelt sein müssen. Die infektiösen PrP^{Sc}-Fibrillen wurden nicht mehr für die Toxizität verantwortlich gemacht, sondern lösliche Oligomere oder Aggregationsintermediate (Hill und Collinge, 2003; Siveira *et al.*, 2005; Chesebro *et al.*, 2005; Fioriti *et al.*, 2005).

Für die SELEX 4 wurde deshalb ein *in vitro* aggregiertes Oligomer des Prionproteins als Zielmolekül verwendet, bei dem es sich wahrscheinlich um eine stabile Zwischenstufe auf dem Weg zur Aggregation des Prionproteins handelt (Redecke *et al.*, Manuskript eingereicht).

Das Oligomer wurde von der Gruppe von Prof. Dr. C. Betzel, Universität Hamburg zur Verfügung gestellt.

4.2.4.2 Charakterisierung des Oligomers O1

Oxidativer Stress nimmt nachweislich mit höherem Alter zu und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen (Glaser *et al.*, 2005; Guentchev *et al.*, 2000; Van Everbroeck *et al.*, 2004). Obwohl die physiologische Funktion des zellulären Prionproteins bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, wird u. a. vermutet, dass das Protein eine neuroprotektive Signalwirkung ausübt, in dem es in dem Antioxidationsignalweg von neuronalen Zellen involviert ist (Brown *et al.*, 1999b; 2001b; 2005). Nach einer Prioninfektion bricht die antioxidative Protektion der Zelle zusammen und nachhaltige Schäden entstehen (Lee *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001; Milhavet *et al.*, 2000). Durch die oxidativen Bedingungen in der Zelle werden Protein beschädigt und eine Konformationsänderung induziert (Requena *et al.*, 2001; 2004; Lee *et al.*, 2003).

Um den oxidative Stress in der Zelle zu simulieren und dadurch den Einfluss der oxidativen Umgebung auf die Struktur des Prionproteins zu untersuchen, wurde *in vitro* ein oxidatives Umfeld mit Hilfe von Cu^0 geschaffen (Redecke *et al.*, Manuskript eingereicht). In *E. coli* überexprimiertes monomeres maPrP^{C} (23-231) veränderte durch die Metall-induzierte Oxidation (vermutlich an Histidin- und Methioninresten) seine elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften. Die Energiebarriere der β -Faltblatt-Konformation wurde gesenkt und es kam zur spontanen Umwandlung des monomers PrP^{C} in Oligomere mit einem hohen β -Faltblatt-Anteil. Es erfolgte die Bildung von zwei verschiedenen Oligomeren O1 und O2. O1 ist anisometrisch, wird als Hauptprodukt gebildet und erscheint im DLS (*Dynamic Light Scattering*) bei einer Größe von 15 nm (vgl. 4.3.2). O2 ist mehr diffus, heterogener, wird später gebildet als O1 und besitzt eine Größe von 30 nm in DLS-Messungen (Redecke *et al.*, Manuskript eingereicht). Durch Zentrifugation lassen sich die beiden verschiedenen Oligomere voneinander trennen.

Für die SELEX 4 wurde das Oligomer O1 als Zielmolekül verwendet, da es sich gut charakterisieren und klar definieren lässt. Es kann reproduzierbar und in großer Reinheit hergestellt werden. Die Oligomere sind über mehrere Wochen stabil und löslich. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Oligomere O1 als globuläre Plaques zu beobachten (Abb. 4-26, B und C). Während monomeres Prionprotein (Abb. 4-26, A) nicht im Elektronenmikroskop zu detektieren ist, bildet das Oligomer eine regelmäßige Form mit einem Durchmesser von ungefähr 10-20 nm. Die Größe und

Morphologie der Partikel sind vergleichbar mit den von Silveira *et al.* (2005) als höchst infektiös charakterisierten Oligomeren, die unter 4.2.4.1 schon näher beschrieben wurden. Im Hinblick auf die neu aufgeworfene Frage des neurotoxischen Agens der TSE-Krankheiten stellt sich das für die Selektion verwendete Oligomer als höchst interessantes Zielmolekül vor. Im Gegensatz zu den aus Hamsterhirn isolierten PrP^{Sc} (Abb. 4-9) bilden die Oligomere O1 homogene und lösliche Aggregate, die sich gut für eine *in vitro* Selektion einsetzen lassen. Durch die lange Stabilität der Oligomere sollte die Präsentation derselben Epitope in jeder Selektionsrunde gewährleistet sein. Ein weiterer Vorteil der Oligomere ist ihre Reinheit. Da rekombinantes PrP^C *in vitro* aggregiert wurde, sind auch keine Verunreinigungen wie bei dem aus Hamsterhirn isolierten PrP^{Sc} zu finden.

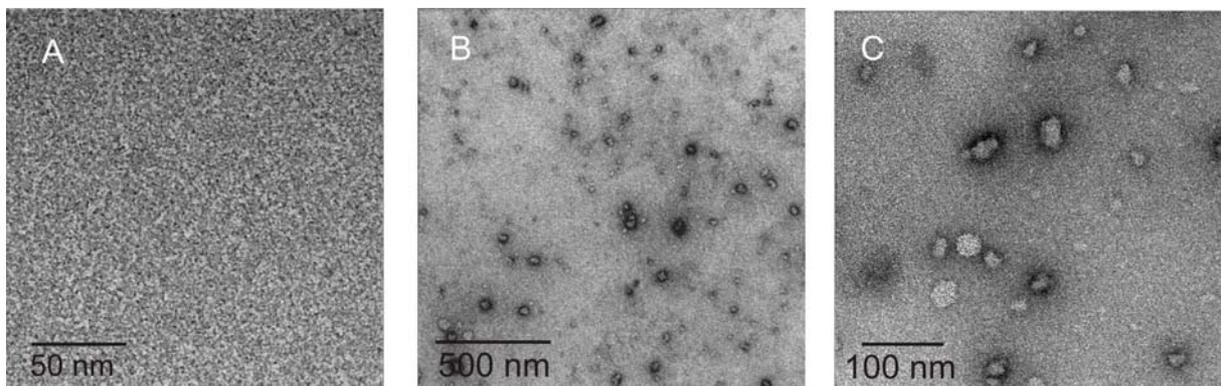


Abbildung 4-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von monomeren und oligomeren (O1) PrP^C (23-231). A: Aufnahme von 500 ng/μl PrP^C (23-231) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0 B und C: Aufnahmen von 300 ng/μl O1 in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0. Die Proben wurden mit 2 % Uranylacetat gefärbt. Die Aufnahmen entstanden mit Unterstützung von Dr. Rudi Lurz am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin.

Aus SAXS-Messungen (*Small-angle X-ray scattering*) ist ein Molekulargewicht von 405 (± 20) kDa für das Oligomer O1 bekannt (persönliche Kommunikation mit Dr. L. Redecke, Universität Hamburg). Daraus lässt sich berechnen, dass das Oligomer O1 aus etwa 17 Monomereinheiten des Prionproteins aufgebaut ist. Da sich über die genaue Anordnung der Monomere innerhalb des Aggregats keine Aussage machen lässt, können zwei extreme Annahmen über die Zugänglichkeit der Monomere gemacht werden: Erstens können alle Monomereinheiten auf der Oberfläche des Oligomers frei zugänglich sein und eine Bindung eingehen (Fall 1) und zweitens besitzt das Oligomer nur ein mögliches Bindungsepitop (Fall 2). Wahrscheinlich werden einige Monomere im Innern des Oligomers verdeckt oder Epitope durch sterische Hinderungen nicht frei zugänglich sein, so dass die Zahl der präsentierten Epitope zwischen den beiden Fällen liegen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Konzentrationsberechnungen des Oligomers das Molekulargewicht des

monomeren PrP^C von 23 kDa verwendet, d.h. es wurde von der maximalen Anzahl an zugänglichen Epitopen (Fall 1) ausgegangen. Dadurch ist ein Vergleich der Messungen zwischen dem Oligomer und dem Monomer möglich.

Die RNA-Stabilität in Gegenwart von Oligomer O1 wurde überprüft, indem radioaktiv markierte RNA-Bibliothek zu gleichen Anteilen mit dem Oligomer für eine Stunde inkubiert wurde. Die isolierten RNA-Moleküle aus dem RNA-Protein Komplex - über ein PAA-Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht - zeigten keine Abbaubanden und liefen auf der gleichen Höhe wie die Kontrolle (Abb. 4-27). In Gegenwart der *in vitro* aggregierten Oligomere konnte also keine Degradation der RNA-Bibliothek beobachtet werden.

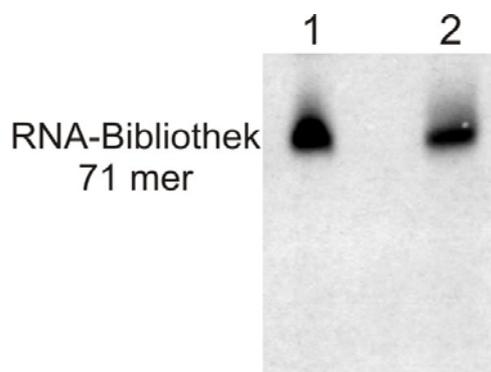


Abbildung 4-27: Einfluss von *in vitro* aggregierten Oligomer O1 von PrP auf die Stabilität der RNA-Bibliothek. 1: Kontrolle. 2: 100 pmol radioaktiv markierte RNA-Bibliothek wurden mit 100 pmol Oligomer für 1 h inkubiert. RNA-Protein Komplexe wurden auf einem Nitrozellulosefilter gesammelt, mit dem 30-fachen Volumen 1x Selektionspuffer 4 gewaschen und mit 7 M Harnstoff denaturiert. Isolierte RNA-Moleküle wurden auf einem 10 % PAA-Gel aufgetragen.

4.2.4.3 Erstellung der Bibliothek 4 (RNA)

Für die SELEX 4 wurde eine RNA-Bibliothek verwendet, die insgesamt 71 Nucleotide lang ist und Primerregionen von 15 bzw. 16 nt Länge sowie einen randomisierten Bereich von 40 Nucleotiden beinhaltet (für die Sequenz siehe Anhang 9.1, Ruckman *et al.*, 1998). Die einzelsträngige DNA-Bibliothek wurde von der Firma TIB Molbiol im Synthesemaßstab von 1 µmol hergestellt. Die chemisch synthetisierte DNA (5 nmol; $3,0 \cdot 10^{15}$ verschiedene Moleküle) konnte ohne vorherige Reinigung in der präparativen PCR innerhalb von 10 Zyklen mit einer Amplifikationsrate von sechs vermehrt werden. Für die präparative T7-Transkription wurden von der DNA-Matrize 5 nmol verwendet, die mit einem Vermehrungsfaktor von acht in RNA umgeschrieben wurden. Nach der Reinigung über ein denaturierendes PAA-Gel lagen noch ungefähr die Hälfte der transkribierten RNA-Moleküle vor (22,3 nmol). Für die erste Selektionsrunde wurden 4 nmol der RNA-Bibliothek (ungefähr $1,5 \cdot 10^{15}$ verschiedene Moleküle) eingesetzt. In den folgenden Runden wurde die verwendete Menge an RNA von 1,5 nmol auf 1,0 nmol verringert (siehe Material und Methoden, 3.2.7).

4.2.4.4 Durchführung der SELEX 4

Im Unterschied zu den anderen durchgeführten *in vitro* Selektionen wurden hier zur Trennung der RNA-Oligomer Komplexe von ungebundenen RNA-Molekülen Nitrozellulosefilter verwendet (Ruckman *et al.*, 1998). Im Allgemeinen binden Proteine unspezifisch an der Membranoberfläche, während freie RNA-Moleküle den Filter passieren.

Als Reaktionspuffer wurde mit Selektionspuffer 4 (20 mM HEPES, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) gearbeitet. Der Puffer enthielt im Vergleich mit den anderen verwendeten Selektionspuffern kein BSA, das unspezifisch an die Nitrozellulosemembran binden würde.

Vor jeder Selektionsrunde fand eine Präselektion gegen die Nitrozellulosemembran statt, in dem die radioaktiv markierte RNA nur mit dem Filter inkubiert wurde, um unspezifische Matrixbinder zu entfernen. Danach wurde die RNA-Bibliothek mit dem Oligomer im Verhältnis RNA : Protein von 5 : 1 in der ersten Runde und von 10 : 1 in den folgenden Runden bei Raumtemperatur inkubiert. In der Anfangsrunde wurde ein niedrigeres Verhältnis als in den restlichen Runden gewählt, um eine relativ hohe Bindung von RNA-Molekülen von ungefähr 1,8 % zu erreichen. Die Bibliothek sollte nicht zu Beginn der Selektion stark dezimiert werden, um potentielle Binder-Moleküle nicht durch einen hohen Konkurrenzdruck zu verlieren.

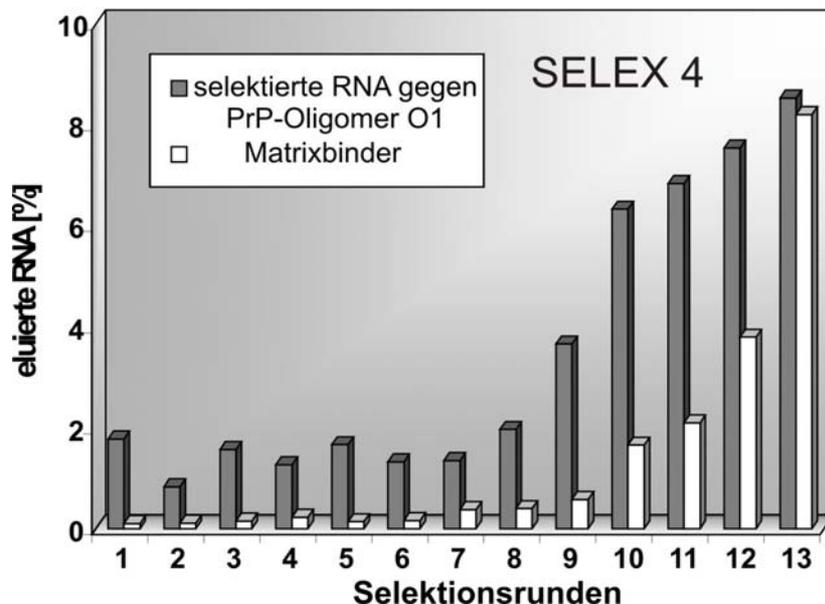


Abbildung 4-28: Anteil der selektiv eluierten RNA bzw. der Matrixbinder je Selektionsrunde der SELEX 4. Das Diagramm zeigt den Anteil an RNA, der nach jeder Selektion mit dem Zielmolekül O1 (graue Balken) bzw. ohne das Zielmolekül (weiße Balken) von dem Filter eluiert werden konnte. In der ersten Runde wurde ein RNA : Protein-Verhältnis von 5 : 1, ab der 2. Runde ein Verhältnis von 10 : 1 verwendet.

Nach der Inkubation wurde der Ansatz über die Nitrozellulosemembran filtriert und ausgiebig mit der 30-fachen Menge des Ansatzes an Selektionspuffer gewaschen. Die gebundenen RNA-Moleküle wurden mit 7 M Harnstoff isoliert und im Szintillationszähler vermessen.

Durch die Erhöhung des Verhältnisses von RNA : Protein wurde in der zweiten Runde ein geringeres Signal an gebundenen RNA-Molekülen von 0,8 % detektiert. In den folgenden Zyklen stieg der Wert wieder im Durchschnitt auf 1,6 % an. Ab der achten Runde erfolgte die Vermehrung des Anteils an gebundener RNA bis schließlich in der 13. Runde 8,5 % RNA-Moleküle von der Membran eluiert werden konnten. In Abbildung 4-28 sind die Ergebnisse der Selektion dargestellt. Trotz vorangehender Präselektion gegen die Membran, konnte wieder eine Anreicherung an unspezifischen Matrixbindern festgestellt werden, so dass nach dem 13. Selektionszyklus ausschließlich Membran-affine RNA Moleküle isoliert wurden. Da ab der 10. Selektionsrunde nur noch ein geringer Anstieg von Target-affinen RNA-Molekülen zunahm bei vergleichsweise starkem Anstieg an Matrixbindern, wurden die PCR-Produkte aus der 11. Runde kloniert.

4.2.4.5 Sequenzanalyse der SELEX 4

Die PCR-Produkte der elften Runde der SELEX 4 wurden in den pGEM[®]-T Vektor ligiert und geklont wie unter 4.2.3.6 beschrieben. Anschließend wurden 28 positive Klone ausgewählt und von der Firma *Sequence Laboratories* Göttingen GmbH sequenziert. Aus den insgesamt 28 analysierten Klonen konnten 18 verschiedene Sequenzen identifiziert werden, die in unterschiedlichen Häufigkeiten auftraten (Tab. 4-8). Dabei waren 12 Sequenzen (43 %) nur einmal vertreten.

Tabelle 4-8: Häufigkeit der gefundenen 18 verschiedenen Sequenzen der SELEX 4 bezogen auf den gesamten analysierten Sequenzpool.

Klon	Anzahl der Sequenzen	Häufigkeit der Sequenzen [%]
S4-15	5	17,8
S4-16	3	10,6
S4-3	2	7,1
S4-7	2	7,1
S4-23	2	7,1
S4-28	2	7,1
S4-1	1	3,6
S4-2	1	3,6
S4-5	1	3,6
S4-6	1	3,6
S4-8	1	3,6
S4-9	1	3,6
S4-10	1	3,6
S4-11	1	3,6
S4-13	1	3,6
S4-18	1	3,6
S4-19	1	3,6
S4-22	1	3,6
	28	100

Da vor der Sequenzanalyse keine Bindungsstudien unternommen wurden, konnte keine Aussage über Binder oder Nicht-Binder gemacht werden. Die Klone wurden mit S4-x bezeichnet, wobei S4 für SELEX 4 und x für den entsprechenden Klon steht. Die Länge der Sequenzen variierte zwischen 70-72 Nucleotiden (vgl. 4.2.3.7).

Die ermittelten Sequenzen der SELEX 4 wurden analog zur SELEX 3 auf gemeinsame Primärstruktur motive im ursprünglich randomisierten Bereich überprüft. Für den Vergleich der Sequenzen wurde das Programm *ClustalX* benutzt. Tabelle 4-9 zeigt die gefundenen konservierten Bereiche und ihre Häufigkeit im Sequenzpool.

Motiv 4-1

```

S4-19      ---TAACAC GG TGGAGTGGGG-AGTTATTTCGCAGTC---ATGGGGT
S4-05      -----AC GTC TGGAGTAGGG-AGGAATTGACGTTCCCAATGGGGT
S4-02      TAATTGTAC GA TGGTGGAGGG-AGGAGT GTACATGCT-GCCA---
S4-01      ---TAGCAGTTTCTGGAGGAGGG-AGG TTTGAAA CTGTCCGGTG---
S4-23      -AACCAAGGATTGCTGGAGTAGGG-AGG TTTGCGATCCGT- GTG---
S4-15      TGTCCACA -- GA TGGAGGAAG-TAGGGATTGTGTGCACT-ATG---
S4-09      --ACCTCNN-ACATGGTG-AGAGTAGGGA--GTNTNANGNTNTGNGT-
Konsensus          *** * * * * **

```

Motiv 4-2

```

S4-08      -----ACC AATGGGGAAC TAGTAGGTCACGTC TGGAAATGTGCGC
S4-22      CGCTTGACGCAAAACGGTAGGAGTGGGGAATGCGTGCTG
S4-07      -----AGGTGTGGGGAATCGTCCAGAGTTGTTTGACAGT-TGCGGT
S4-19      -----TAACACGG-TGGAGTGGGGAGTTATTTCGCAGTC---ATGGGGT
Konsensus          ** * * * * *

```

Motiv 4-3

```

S4-16      GATTGGTTACCCGCTTAGGTCGTAGACAGGTGTATGTGCA-----
S4-18      -----CCGCCGTCGAGGCTGAGAC GGTGAGTGCCAAGGTATG
Konsensus          *** * * * * * * *

```

Motiv 4-4

```

S4-03      ---ACAGAGGA--TCGTTCCATTGGAGGTATGTTTCGTTTCGTGGTA
S4-28      ACTACAGTGGACATCAATACGTTGATGGCATGC-CACGCA-----
Konsensus          * * * * * * * * * *

```

Motiv 4-5

```

S4-19      TAACACGGTGGG--GTGGGGAGTTATTTCGCA-GTCATG-GGGT--
S4-07      AGGTGTGGGGAATCGTCCAGAGTTGTTTGACAGT--TG-CGGT--
Konsensus          * * * * * * * * * * * *

```

Motiv 4-6

```

S4-06      GTAGAGCGGTTAAACTTTTGTGGTTTGGCTTGT GTTTTGCA-----
S4-13      ---GGGATGCTGA---TTGCA--TTGGCTTGTCTGTTTTTAACCCGCCA
Konsensus          * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 4-29: Primärstrukturen ausgewählter Sequenzen der SELEX 4. Es wurde jeweils nur die ehemalige Zufallssequenz ohne die Primerbereiche analysiert. Ähnliche DNA-Sequenzen sind anhand der gefundenen Motive so zusammengefasst, dass konservierte Bereiche (grau unterlegt) übereinander liegen. Lücken, die sich aus dieser Anordnung ergeben, sind mit Bindestrichen aufgefüllt. Der Konsensusbereich der jeweiligen Motive ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Anhand der Sequenzmotive konnten die Klone in Motivfamilien unterteilt werden, die in Abbildung 4-29 abgebildet sind. Die ersten beiden sehr ähnlichen Motive sind in über 50 % der Sequenzen enthalten, dagegen sind die restlichen konservierten Motive nur in jeweils zwei der Klone aufzufinden. Es lässt sich vermuten, dass die Motive 4-1 und 4-2 für die Bindung eine wichtige Rolle spielen, da sie in vielen Sequenzen konserviert sind. In diesen Motiven sind auffällig viele G- und A-Nucleotide teilweise als Triplet oder Quartett vorhanden. Wegen der hohen Anzahl an G-Nucleotiden ist eine G-Quartett-Struktur denkbar. In den Motiven 4-5 und 4-6 überwiegen dagegen U-Nucleotide. Analog zur SELEX 3 wurden auch hier Sekundärstruktur-Vorhersagen mit dem Programm *RNA-FOLD* (Zuker, 1989) durchgeführt. In den Abbildungen 4-30 und 4-31 sind die potenziellen Sekundärstrukturen ausgewählter Sequenzen dargestellt. Die Strukturen wurden mit der gesamten Sequenz, also auch mit den Primerregionen, die in den Bereichen von 1-15 nt und 56-71 nt liegen, vorhergesagt. Teilweise konnten für eine Sequenz mehrere Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen Energien ermittelt werden, von denen jeweils nur die stabilste Struktur dargestellt wurde.

Tabelle 4-9: Häufigkeit und Vorkommen der konservierten Primärstrukturmotive der SELEX 4. Die konservierten Sequenzen (in Klammern die Anzahl der Nucleotide) sind nach ihrer Häufigkeit im gesamten untersuchten Sequenzpool (28 Sequenzen) sortiert. (**Y** = C oder T, **R** = A oder G, **S** = G oder C, **W** = T oder A, **M** = C oder A, **K** = G oder T, **X** = gap oder N, **N** = A, C, G oder T)

Motiv Nr.	konservierte Basenabfolge	verschiedene Sequenzen	Sequenzen insgesamt	Häufigkeit der Sequenzen [%]
4-1	TGGWGKRRRGXAGG (14)	S4-1, S4-2, S4-5, S4-9, S4-15, S4-19, S4-23	12	43
4-2	GGWRTGGGGAR (11)	S4-7, S4-8, S4-19, S4-22	5	18
4-3	AGGTCKKAGACXGGTG (16)	S4-16, S4-18	4	14
4-4	ACAGWGGGA (8)	S4-3, S4-28	4	14
4-5	GAGTTRTTYGCA (12)	S4-7, S4-19	3	11
4-6	TTGGCTTGTXGTTTT (16)	S4-6, S4-13	2	7

Die Strukturen, die das Motiv 4-1 bzw. 4-2 enthalten, sind sich sehr ähnlich. Sie bestehen hauptsächlich aus einem Doppelstrang, der durch innere Loops, *mismatches* oder Bulges verschiedener Größe unterbrochen wird und in einem großen Loop endet. Die Aptamere S4-2 und S4-19 sind Beispiele aus den Motivfamilien 4-1 und 4-2 (Abb. 4-30). Die Motive befinden sich genau in dem relativ großen Bereich von 16 Nucleotiden, der einzelsträngig vorliegt, entweder in dem terminalen Loop (z.B. bei S4-2 (U27-G43) oder S4-19 (U24-C42)

siehe Abbildung 4-30) oder in einem Bulge (z.B. bei S4-8 (G40-A46), nicht gezeigt). Diese Motive scheinen sich in einer Region der Struktur zu befinden, die relativ flexibel ist, und eine Bindungstasche bilden kann. Durch die Helix werden diese Bereiche wahrscheinlich stabilisiert. Die starke Konservierung des Sequenzmotivs deutet auf einen Einfluss bei der Bindung an das Zielmolekül hin. Die Primerregionen paaren meistens mit sich selbst oder untereinander und haben wahrscheinlich nur eine stabilisierende Funktion.

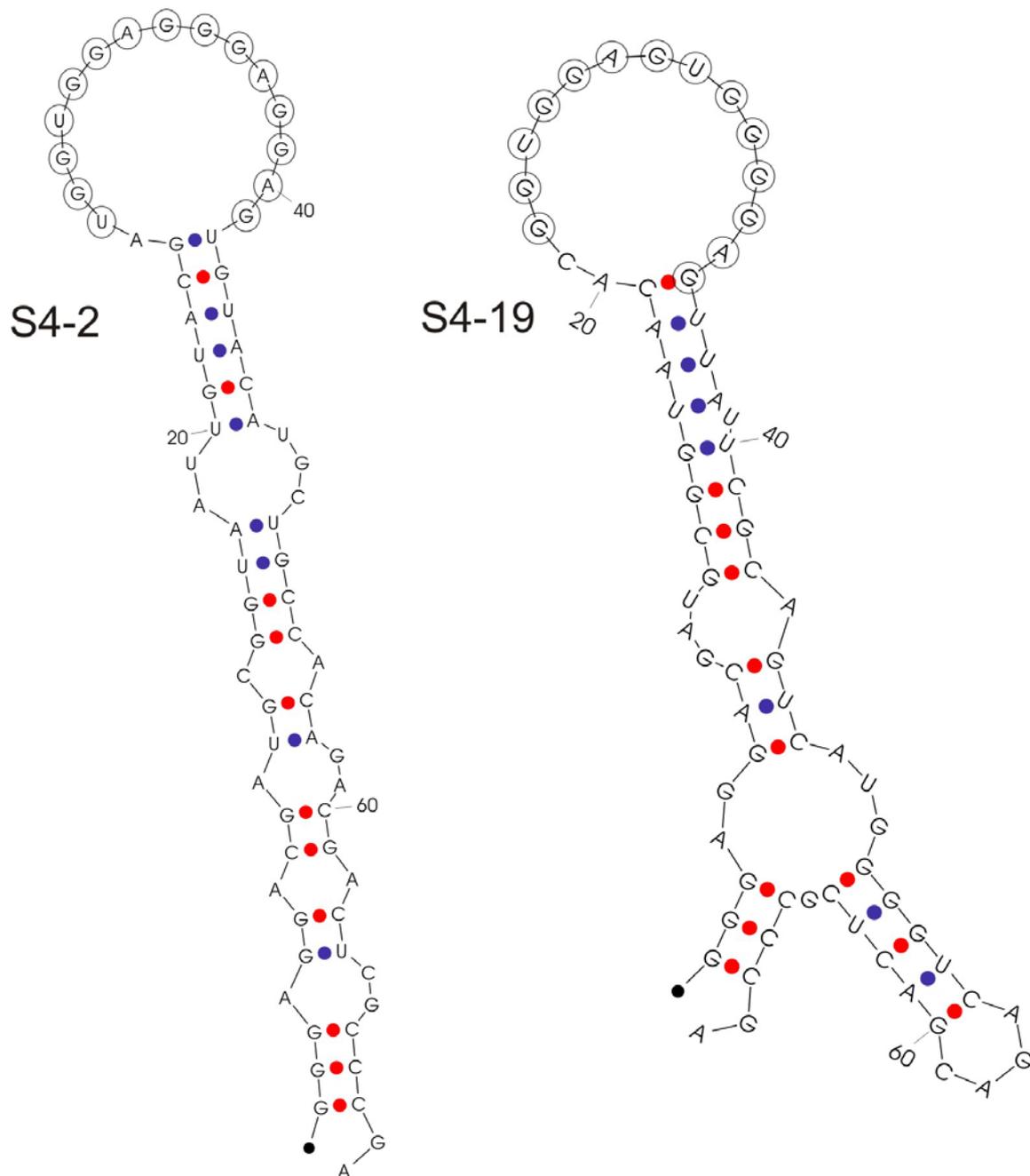


Abbildung 4-30: Sekundärstrukturmodelle ausgewählter Sequenzen der SELEX 4. Die jeweiligen Motive sind mit Kreisen gekennzeichnet. Starke Basenpaare (G-C) wurden mit roten Kreisen, schwache Basenpaare (A-T oder Wobble-Basenpaarung) mit blauen Kreisen markiert.

Das Sequenzmotiv 4-3 in den Aptameren S4-16 (Abb. 4-31) und S4-18 (nicht gezeigt) bildet auch ein konserviertes Strukturmotiv. Der erste Abschnitt des Motivs AGGUCKK liegt mit einem Teil des Reverse-Primers gepaart vor. Der folgende Abschnitt AGACRG ist einzelsträngig und formt die eine Seite eines inneren Loops. Dieser relativ große Loop ist wahrscheinlich flexibel und könnte an der Bindung an das Prionprotein beteiligt sein. Durch die angrenzenden helikalen Bereiche kann das Bindungsmotiv stabilisiert werden.

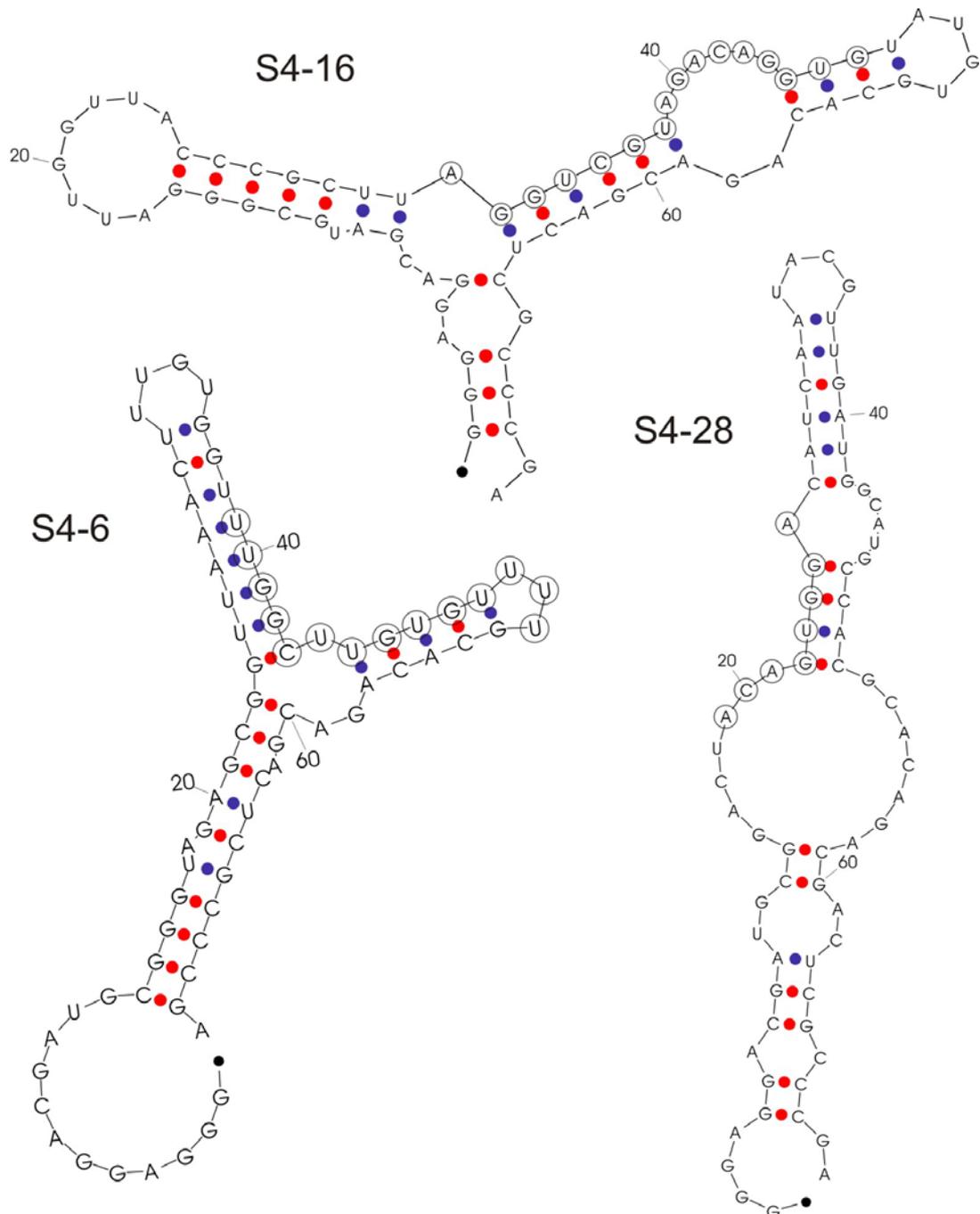


Abbildung 4-31: Sekundärstrukturmodelle ausgewählter Sequenzen der SELEX 4. Die jeweiligen Motive sind mit Kreisen gekennzeichnet. Starke Basenpaare (G-C) wurden mit roten Kreisen, schwache Basenpaare (A-T oder Wobble-Basenpaarung) mit blauen Kreisen markiert.

Für die Sequenzmotive 4-4, 4-5 und 4-6 konnten keine konservierten strukturellen Elemente gefunden werden. Die Aptamere S4-3 (nicht gezeigt) und S4-28 (Abb. 4-31) lassen sich zwar in eine ähnliche Sekundärstruktur falten, jedoch liegt das Motiv 4-4 in unterschiedlichen Bereichen. Während bei S4-3 die Nucleotide ACA doppelsträngig und die Nucleotide GWGG einzelsträngig vorliegen, ist es bei S4-28 genau umgekehrt. Es ist jedoch bemerkenswert, dass in dem Bereich des Sequenzmotivs ein innerer Loop ausgebildet wird, der auf der einen Seite aus vier bzw. aus fünf einzelsträngigen Nucleotiden und auf der anderen Seite aus einem einzelnen Adenosin aufgebaut ist. Wenn auch die Sequenz in diesem inneren Loop nicht übereinstimmt, so ist der strukturelle Aufbau doch ähnlich.

Das Sequenzmotiv 4-5 liegt in dem Aptamer S4-19 mit dem Forward-Primer gepaart vor, während es in dem Aptamer S4-7 mit dem Reverse-Primer eine Helix bildet. Diese Sequenz ist wahrscheinlich komplementär zu den Primern selektiert worden, da sie den Aptameren eine größere Stabilität verleiht. Deshalb wird es sich bei dieser Sequenz um kein gemeinsames Bindungsmotiv handeln. Für die Aptamere S4-6 (Abb. 4-31) und S4-13 (nicht gezeigt), die das gemeinsame Motiv 4-6 aufweisen, konnte auch keine übereinstimmende Sekundärstruktur gefunden werden. Das Aptamer S4-6 bildet eine Struktur aus zwei Hairpins und einer Helix, wobei das Motiv 4-6 jeweils die eine Hälfte der beiden Hairpins einnimmt. In der Struktur für das Aptamer S4-13 liegt das Motiv 4-6 mit dem Reverse-Primer gepaart. Allerdings ist die Abfolge der Thyminide in beiden Strukturen einzelsträngig. Trotzdem lassen sich keine strukturellen Gemeinsamkeiten entdecken, so dass es sich bei dem Motiv 4-6 um kein gemeinsames Bindungsmotiv handeln wird.

4.2.4.6 Bindung der Aptamere aus SELEX 4 an oligomeres bzw. monomeres Prionprotein

Mit Hilfe des *Strataclean*TM Assays wurden die Affinitäten ausgewählter Klone der SELEX 4 gegenüber dem Zielmolekül, den PrP-Oligomeren, bzw. gegenüber monomerem PrP^C analysiert (Abb. 4-32). Dazu wurden radioaktiv markierte Aptamere im äquimolaren Verhältnis jeweils mit dem Oligomer O1 bzw. dem monomeren PrP^C inkubiert, die gebildeten Aptamer-Protein Komplexe nach Zugabe von *Strataclean*TM *resins* abzentrifugiert und im Szintillationszähler vermessen. Es stellte sich heraus, dass bei dem gewählten Verhältnis von RNA : Protein von 1 : 1 alle Klone in etwa gleich gut an die Zielmoleküle banden. Analoge Ergebnisse erzielte die als Kontrolle eingesetzte unselektierte RNA-Bibliothek. Während der Selektion wurde ein Verhältnis von RNA : Protein von 10 : 1 gewählt. Nach der 10. Runde konnte eindeutig eine Anreicherung an affinen Bindern festgestellt werden. Der große

Überschuss an RNA während der Selektion könnte hier eine unterschiedliche Bindungsaffinität zwischen dem unselektierten und dem selektierten Pool erklären. Die RNA-Moleküle stehen im Überschuss mehr in Konkurrenz zueinander, so dass sich nur die stärksten Binder durchsetzen können und unspezifische Bindungen eher unterdrückt werden. Bei dem niedrigem Verhältnis von RNA zu Protein, das während des Bindungsassays verwendet wurde, können auch unspezifische Bindungen auftreten, so dass bei der unselektierten Bibliothek eine hohe Affinität für das Zielmolekül festzustellen ist.

Für eine genaue Analyse muss die Bindungskonstante ermittelt werden (siehe 4.2.4.7). Generell besitzt aber anscheinend das PrP-Oligomer eine hohe Kapazität, RNA verschiedener Sequenzen zu binden wie schon aus den Ergebnissen von SELEX 3 hervorgeht. Die Affinität aller Oligonucleotide ist gegen das aggregierte Prionprotein um den Faktor 3-5 höher als gegen das monomere PrP^C.

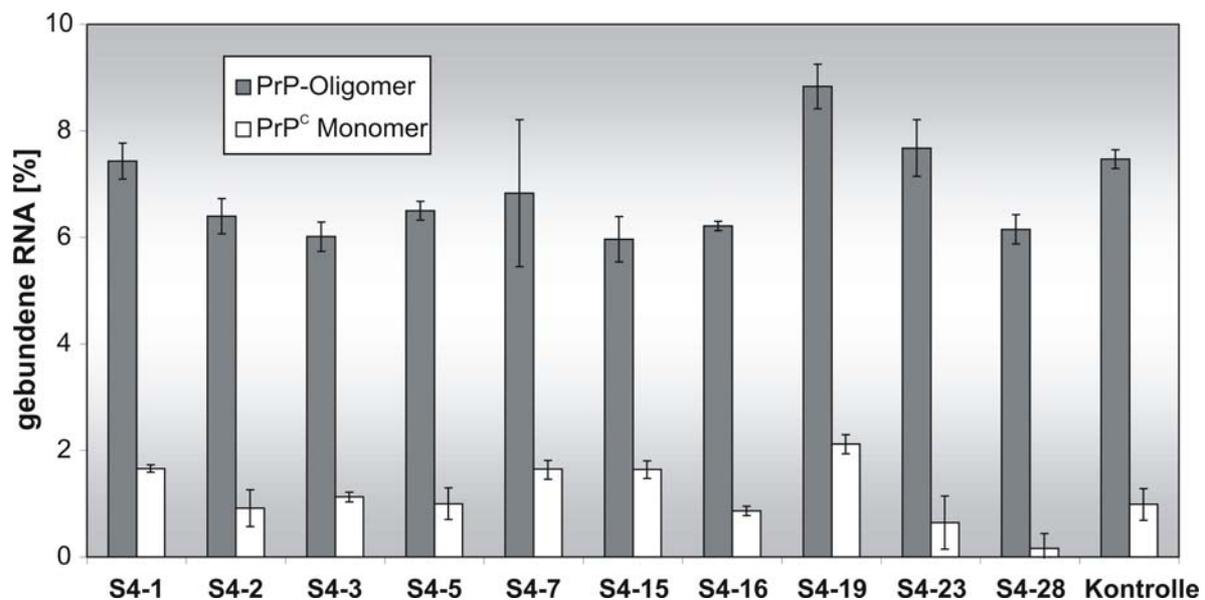


Abbildung 4-32: Affinitäten ausgewählter Klone der SELEX 4 gegen oligomeres bzw. monomeres Prionprotein. 0,5 μM radioaktiv markiertes Aptamer wurde mit 0,5 μM oligomeren PrP O1 bzw. mit 0,5 μM PrP^C inkubiert und die Bindung mittels *Strataclean*TM Assay bestimmt. Die Standardabweichungen resultierten aus gemittelten vierfachen Bestimmungen.

4.2.4.7 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante der Aptamere der SELEX 4 gegen oligomeres bzw. monomeres Prionprotein

Zur genauen Analyse der Bindungseigenschaften der Aptamere der SELEX 4 wurden die apparenten Dissoziationskonstanten für die Bindung der Aptamere gegen oligomeres bzw. monomeres Prionprotein mit Hilfe des *Strataclean*TM Assays, wie unter 4.2.3.10 beschrieben, bestimmt (Abb. 4-33). In Tabelle 4-10 sind die Dissoziationskonstanten für zwei der Aptamere dargestellt. Analog zu den Aptameren der SELEX 3 erreichten die Aptamere der

SELEX 4 für die Bindung an das Oligomer Bindungskonstanten im oberen nanomolaren Bereich. Jedoch konnten im Vergleich zur unselektierten Bibliothek ($K_D = 850$ nM) geringfügig niedrigere Dissoziationskonstanten von $K_D = 640$ nM bzw. $K_D = 680$ nM erreicht werden. Die Aptamere der SELEX 4 scheinen selektiv an ihr Zielmolekül das Oligomer O1 zu binden. Die Affinität für das zelluläre Prionprotein ist um einen Faktor 3 geringer als für die aggregierte Form.

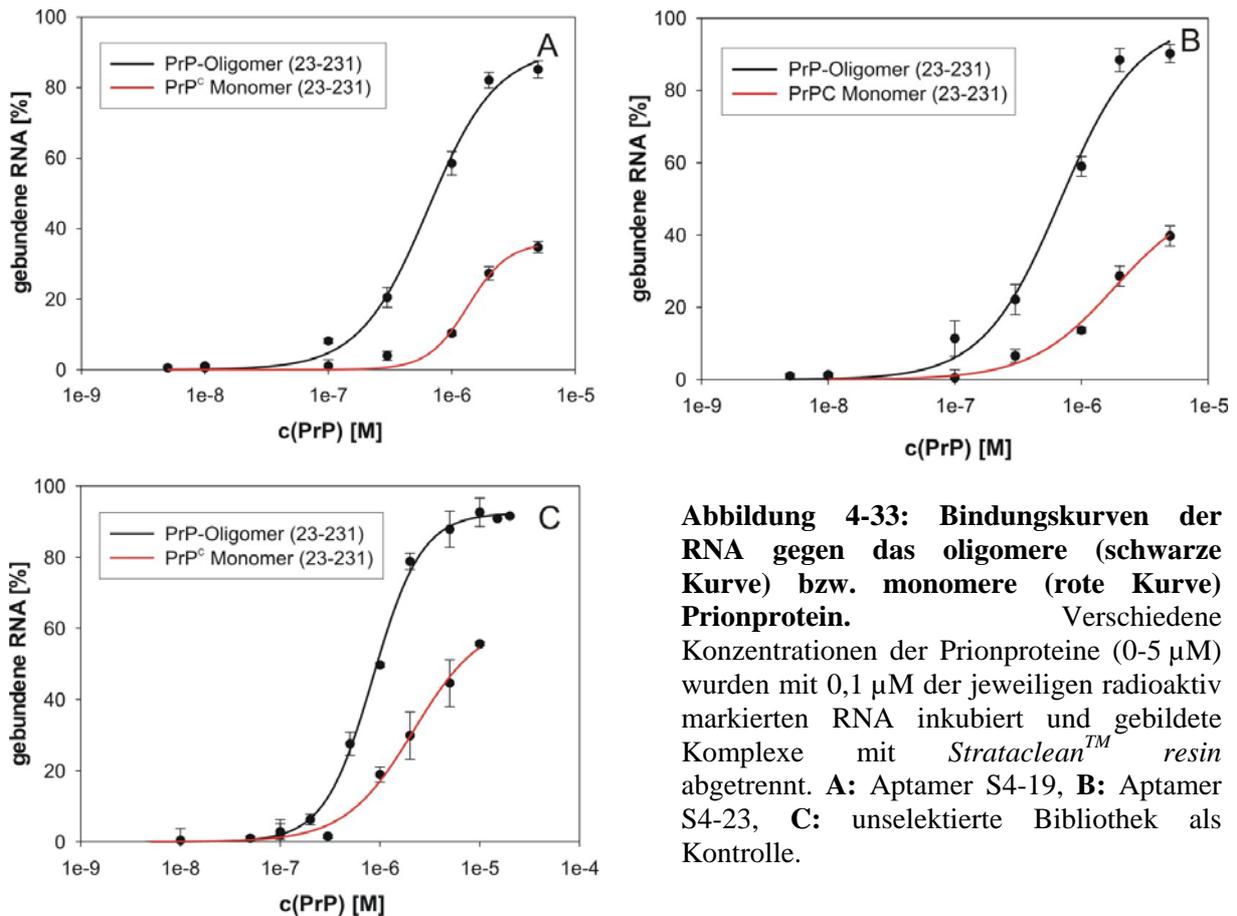


Abbildung 4-33: Bindungskurven der RNA gegen das oligomere (schwarze Kurve) bzw. monomere (rote Kurve) Prionprotein.

Verschiedene Konzentrationen der Prionproteine (0-5 μ M) wurden mit 0,1 μ M der jeweiligen radioaktiv markierten RNA inkubiert und gebildete Komplexe mit *StratacleanTM resin* abgetrennt. **A:** Aptamer S4-19, **B:** Aptamer S4-23, **C:** unselektierte Bibliothek als Kontrolle.

Tabelle 4-10: Apparente Dissoziationskonstanten der Bindung von RNA an das oligomere bzw. monomere Prionprotein.

RNA	K_D (PrP-Oligomer) [μ M]	K_D (PrP ^C Monomer) [μ M]
S4-19	0,64 (\pm 0,08)	1,8 (\pm 0,2)
S4-23	0,68 (\pm 0,14)	2,0 (\pm 0,2)
unselektierte Bibliothek	0,85 (\pm 0,03)	2,2 (\pm 0,5)

4.3 Einfluss von RNA auf die Struktur von PrP^C

4.3.1 Circular dichroismus (CD) -Spektroskopie

Um den Einfluss von RNA auf die Faltung des Prionproteins zu untersuchen, wurden Circular dichroismus-Messungen durchgeführt. Mit CD-Spektroskopie können optisch aktive Substanzen vermessen werden. In Abhängigkeit vom Sekundärstrukturmotiv eines optisch aktiven Moleküls wird links- bzw. rechtszirkular polarisierendes Licht unterschiedlich absorbiert und die Differenz der beiden Absorptionskoeffizienten, als Elliptizität Θ bezeichnet, vermessen. Aus einem Diagramm, in dem die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen ist, können eindeutig Sekundärstrukturelemente wie die α -Helix bestimmt werden. Ein Verlust an Sekundärstruktur und Umfaltungen können sofort anhand des CD-Spektrums detektiert werden. Die Spektren wurden aus drei Einzelmessungen gemittelt und jeweils die Werte für den Hintergrund subtrahiert. Für die RNA konnte bei den gewählten Konzentrationen kein CD-Spektrum ermittelt werden.

Zuerst wurde das Prionprotein PrP^C (23-231) (5 μ M) über einen Zeitraum von 18 Stunden vermessen (Abb. 4-34, Graph A), bei dem die Struktur konstant blieb. Die Spektren weisen Minima bei 208 und 222 nm auf, die eindeutig auf einen großen Anteil an α -Helix hinweisen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Spektren, die bereits in der Literatur beschrieben worden sind (siehe Kapitel 4.1). Anschließend erfolgte die Inkubation von 5 μ M PrP^C (23-231) mit jeweils verschiedenen Konzentrationen (0,05-0,3 μ M) der Aptamere S3-20, S4-19 und der unselektierten Bibliothek. Die Lösungen wurden nach einer halben Stunde im CD-Spektropolarimeter analysiert. Abbildung 4-34, Graph B, zeigt die gemessenen Spektren für die unselektierte Bibliothek. Für die Aptamere ergaben sich die gleichen Ergebnisse wie für die RNA-Bibliothek. Bei einer Zugabe von 0,05 μ M RNA ist noch keine Veränderung in der Faltung des Prionproteins zu bemerken. Aber schon bei einer höheren Konzentration von 0,1 μ M RNA zeigt das Prionprotein eine Tendenz zur Auffaltung. Die Minima des Spektrums liegen noch bei 208 und 222 nm, aber die Kurve hat sich zu größeren Elliptizitätswerten verschoben. Bei weiterer Steigerung der Konzentration der RNA kommt es zu einer weiteren Verschiebung der Elliptizität zu höheren Werten. Außerdem verändert sich die Kurve, so dass keine Minima, die typisch für eine α -Helix sind, zu erkennen sind. Es kommt zu einem kompletten Verlust der Struktur des Prionproteins. Anhand der CD-Messungen lässt sich allerdings nicht feststellen, in welche andere Form sich das Protein umgefaltet hat.

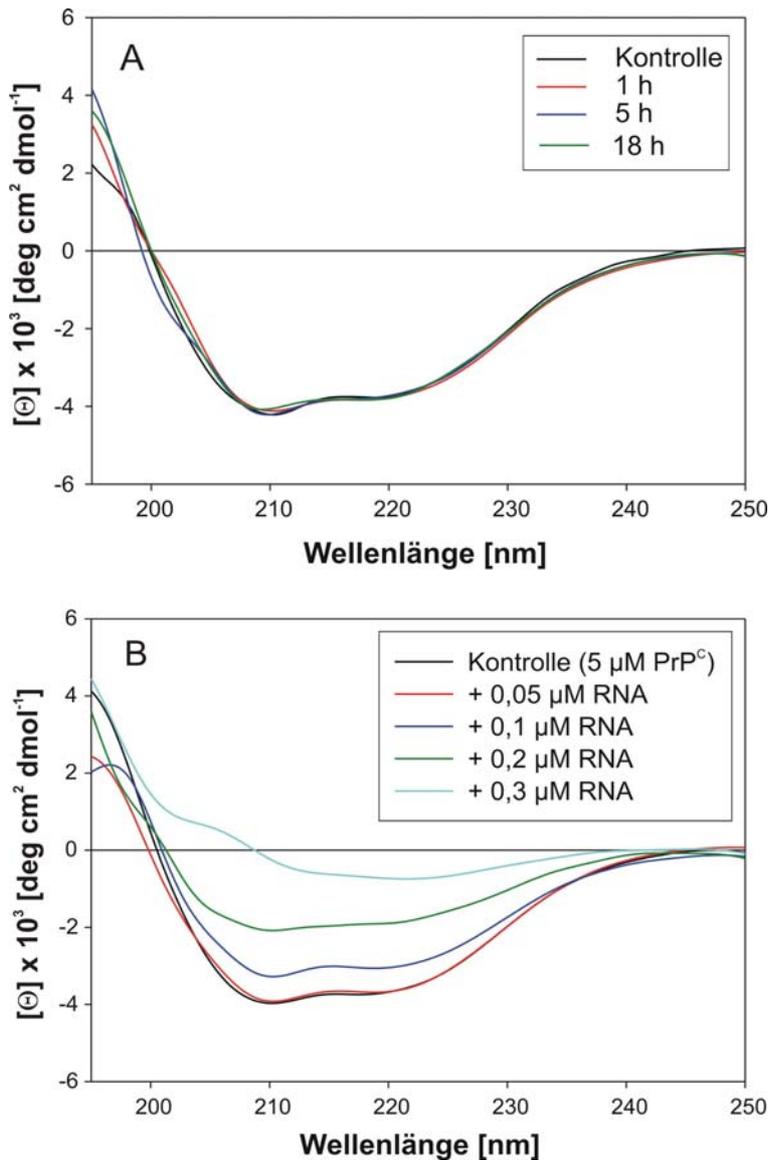


Abbildung 4-34: CD-Spektren des zellulären PrP^C (23-231) – Einfluss von RNA in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Spektren wurden mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter aufgenommen und aus drei Einzelmessungen gemittelt. **A:** 5 μM PrP^C (23-231) wurden über einen Zeitraum von 18 h analysiert. **B:** Zu 5 μM PrP^C (23-231) wurden verschiedene Konzentrationen (0,05-0,3 μM) RNA-Bibliothek gegeben und nach 30 min Inkubation vermessen.

In der Abbildung 4-35, Graphen A-C, wurde der Einfluss der RNA auf die Faltung des Prionproteins in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Bei allen analysierten Konzentrationen kam es zu einem Verlust der Struktur des Prionproteins, allerdings in unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Während bei den geringeren Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,2 μM RNA schon nach einer halben Stunde eine Auffaltung von PrP^C zu beobachten war, dauerte der Prozess noch mehrere Stunden an, bis nach 18 h der Verlust der α -helicalen Struktur zu verzeichnen war. Bei einer Zugabe von 0,3 μM RNA trat eine Umfaltung bereits nach 5 min auf, die nach weiteren 10 min abgeschlossen war.

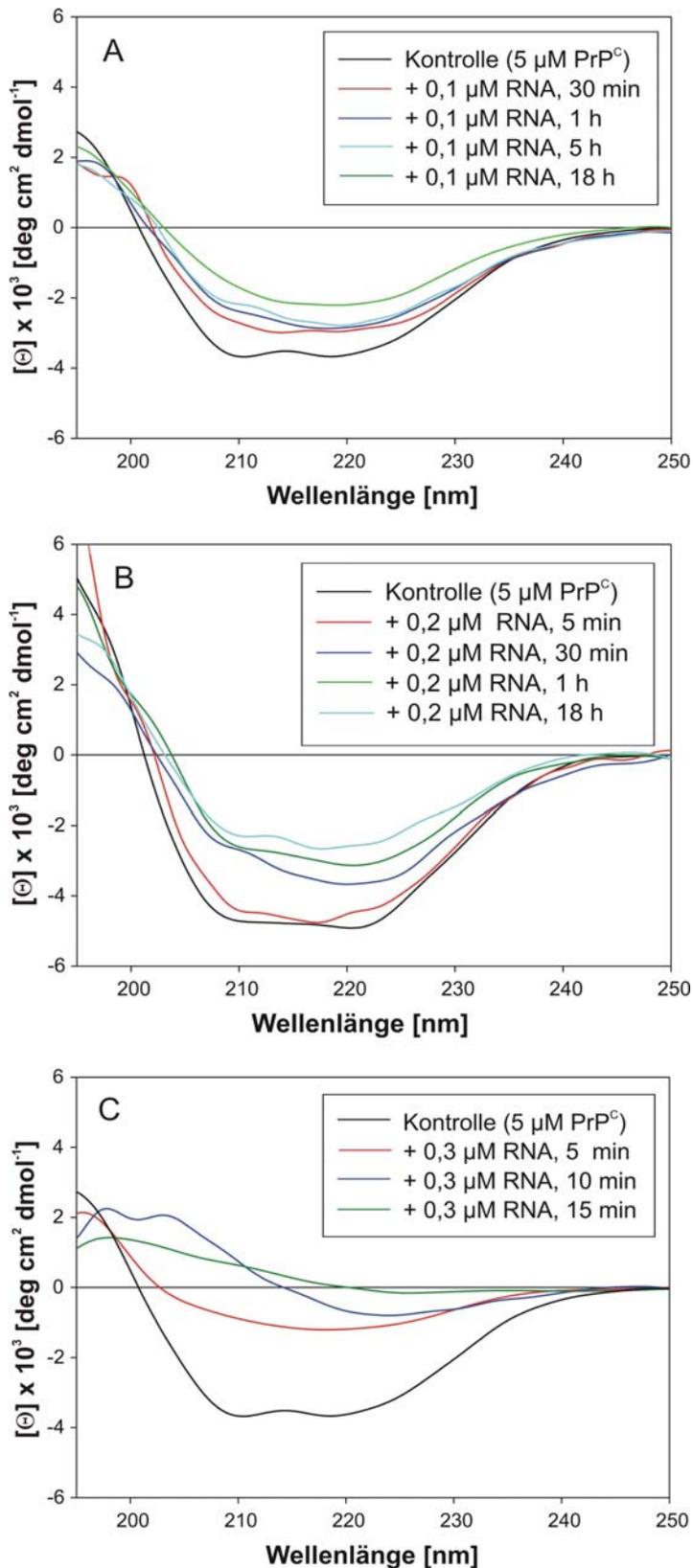


Abbildung 4-35: CD-Spektren des zellulären PrP^C (23-231) – Einfluss von RNA in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit. Die Spektren wurden mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter aufgenommen und aus drei Einzelmessungen gemittelt. **A:** 5 μM PrP^C (23-231) wurden mit 0,1 μM RNA inkubiert und über einen Zeitraum von 30 min bis 18 h analysiert. **B:** 5 μM PrP^C (23-231) wurden mit 0,2 μM RNA inkubiert und über einen Zeitraum von 30 min bis 18 h analysiert. **C:** 5 μM PrP^C (23-231) wurden mit 0,3 μM RNA inkubiert und über einen Zeitraum von 5-15 min analysiert.

Weiterhin wurde untersucht, ob es sich bei der Induktion der Umfaltung von PrP^C um den Einfluss der negativen Ladung der RNA-Moleküle oder um ein RNA-spezifisches Phänomen handelt. Deshalb wurden 5 μM PrP^C (23-231) mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl bzw. Nucleotidtriphosphaten inkubiert, die auch negativ geladen sind, aber keine

Struktur wie Nucleinsäuren ausbilden können. Nach einer halben Stunde erfolgte die Messung der Proben im CD-Spektropolarimeter. Nach der Zugabe von geringen Konzentrationen Salz (0,3-30 μM) war keine größere Veränderung des Prionenproteinspektrums festzustellen (Abb. 4-36, A).

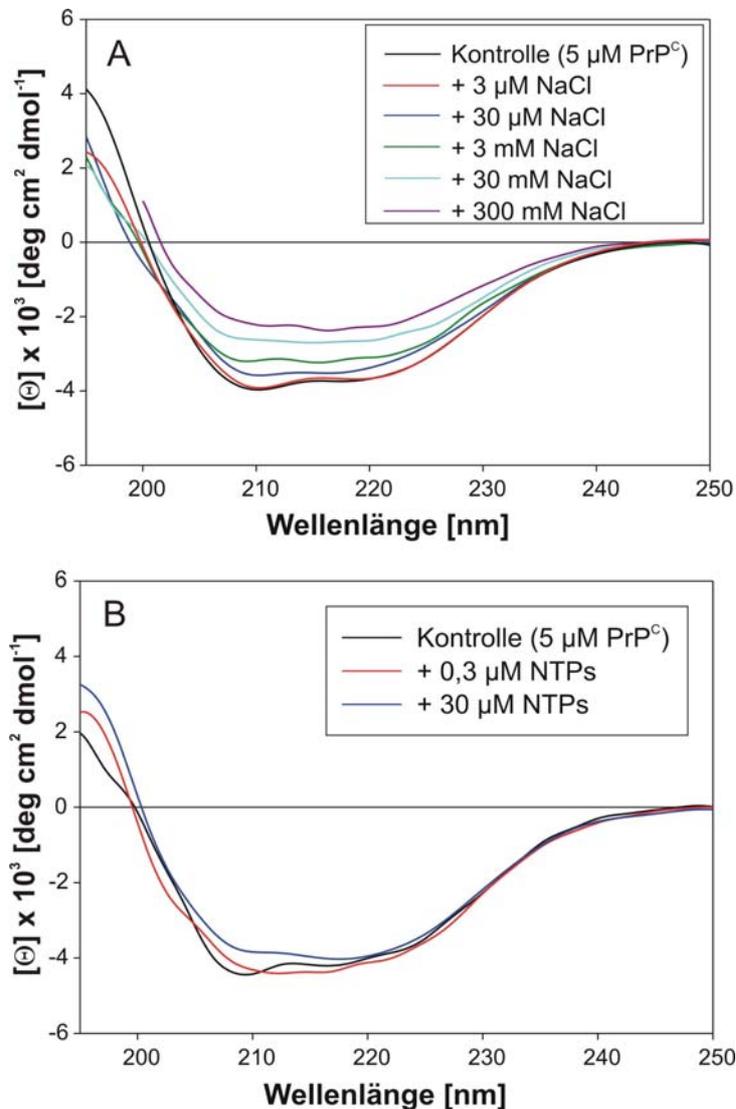


Abbildung 4-36: Einfluss von NaCl bzw. Nucleotidtriphosphaten (NTPs) auf die Struktur des zellulären PrP^C (23-231). Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter aufgenommen und aus drei 3 Einzelmessungen gemittelt. **A:** Zu 5 μM PrP^C (23-231) wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,003-300 mM) NaCl gegeben und die Lösungen nach einer halben Stunde im CD-Spektropolarimeter vermessen. **B:** Zu 5 μM PrP^C (23-231) wurden 0,3-30 μM Nucleotidtriphosphate gegeben und nach einer halben Stunde vermessen.

Erst bei einer Konzentration von 3 mM NaCl, die dem 1000-fachen der RNA-Konzentration entspricht, die einen Umfaltungseffekt beim Prionprotein ausgelöst hat, konnte eine Veränderung des PrP^C-Spektrums detektiert werden. Die Werte der Elliptizität sind angestiegen und die Minima der Kurve sind nicht mehr eindeutig zu bestimmen. Bei Zugabe von höheren NaCl-Konzentrationen wird das Spektrum weiter zu größeren Elliptizitätswerten verschoben, was auf eine Auffaltung und Verminderung der Helices hindeutet. Aber selbst bei der Zugabe von 300 mM NaCl konnte kein vollständiger Verlust der PrP^C-Struktur, analog einer Umfaltung nach Induktion mit 0,3 μM RNA, festgestellt werden.

Nach der Zugabe von 0,3-30 μM Nucleotidtriphosphaten veränderte sich das Spektrum des Prionproteins kaum (Abb. 4-36, B). Das Minimum der Kurve bei 208 nm verschob sich leicht zu höheren Wellenlängen, aber die Werte für die Elliptizität blieben auf demselben Niveau der Kontrolle. Höhere Konzentrationen der Nucleotidtriphosphate konnten nicht mehr vermessen werden, da das Hintergrundrauschen stark anstieg.

Die Versuche sowohl mit Natriumchlorid als auch mit Nucleotidtriphosphaten belegen, dass negative Ladung in ausreichender Konzentration ($>30\mu\text{M}$) einen Einfluss auf die Struktur des Prionproteins hat. Die α -Helices werden wahrscheinlich in Gegenwart der höheren Ionenstärke aufgefaltet, da elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen innerhalb des Proteins geschwächt werden. Nucleinsäure sind durch die Phosphatreste des Rückgrads stark negativ geladen. Durch die negative Ladung kann RNA die Struktur des PrP^C destabilisieren, aber der Einfluss von RNA auf die Faltung scheint über eine rein elektrostatische Wechselwirkung hinaus zu gehen. Wesentlich geringere Konzentrationen von RNA als Salz sind nötig, um die Umfaltung des Prionproteins zu induzieren und einen vollständigen Verlust der nativen Struktur zu verursachen. Eine strukturelle Wechselwirkung zwischen RNA und dem Prionprotein scheint die Auffaltung zu begünstigen.

4.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Mit Hilfe von *Dynamic Light Scattering* (DLS) können Partikelgrößen in Lösung untersucht werden, in dem über die Geschwindigkeit der Teilchen in Lösung ihre Größe anhand der Stokes-Einstein-Gleichung ermittelt wird. Eine Aggregation von Molekülen ist direkt messbar und in einem zwei-dimensionalen Diagramm darstellbar. Abbildung 4-37, Graph A, zeigt die Messung von unselektierter Bibliothek (35 μM) in Wasser. Der hydrodynamische Radius R_H betrug im Durchschnitt 1,1 nm und war über den Zeitraum von einer Stunde konstant. BSA in Wasser besaß einen hydrodynamischen Radius R_H von ungefähr 1,5 nm, der über längeren Zeitraum konstant blieb (Abb. 4-37, Graph B). Auch durch Zugabe von unselektierter Bibliothek veränderte sich der Radius nur wenig. Zwar wurde er zu etwas höheren Werten (2,5 nm) verschoben, aber unter diesen Bedingungen konnte keine Aggregation beobachtet werden.

Der Einfluss von RNA auf das Prionprotein zeigt sich dagegen in anderen Ergebnissen (Abb. 4-37, Graph C und D). PrP-Oligomer (30 μM) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0 lieferte stabile Signale bei einem Radius R_H von ungefähr 15 nm. Wurde RNA (0,1 μM) zu der Probe gegeben, war sofort eine Verschiebung des Signals zu höheren Partikelgrößen

(160 nm im Durchschnitt) festzustellen. Dieser Radius blieb für die restliche Zeit von 45 min konstant. Es konnten bei einigen Messungen auch Partikelgrößen im mikromolaren Bereich detektiert werden, die wieder verschwanden. Werden die Aggregate zu groß und sinken auf den Boden der Küvette, sind sie nicht mehr mittels DLS messbar und es werden keine Signale aufgezeichnet.

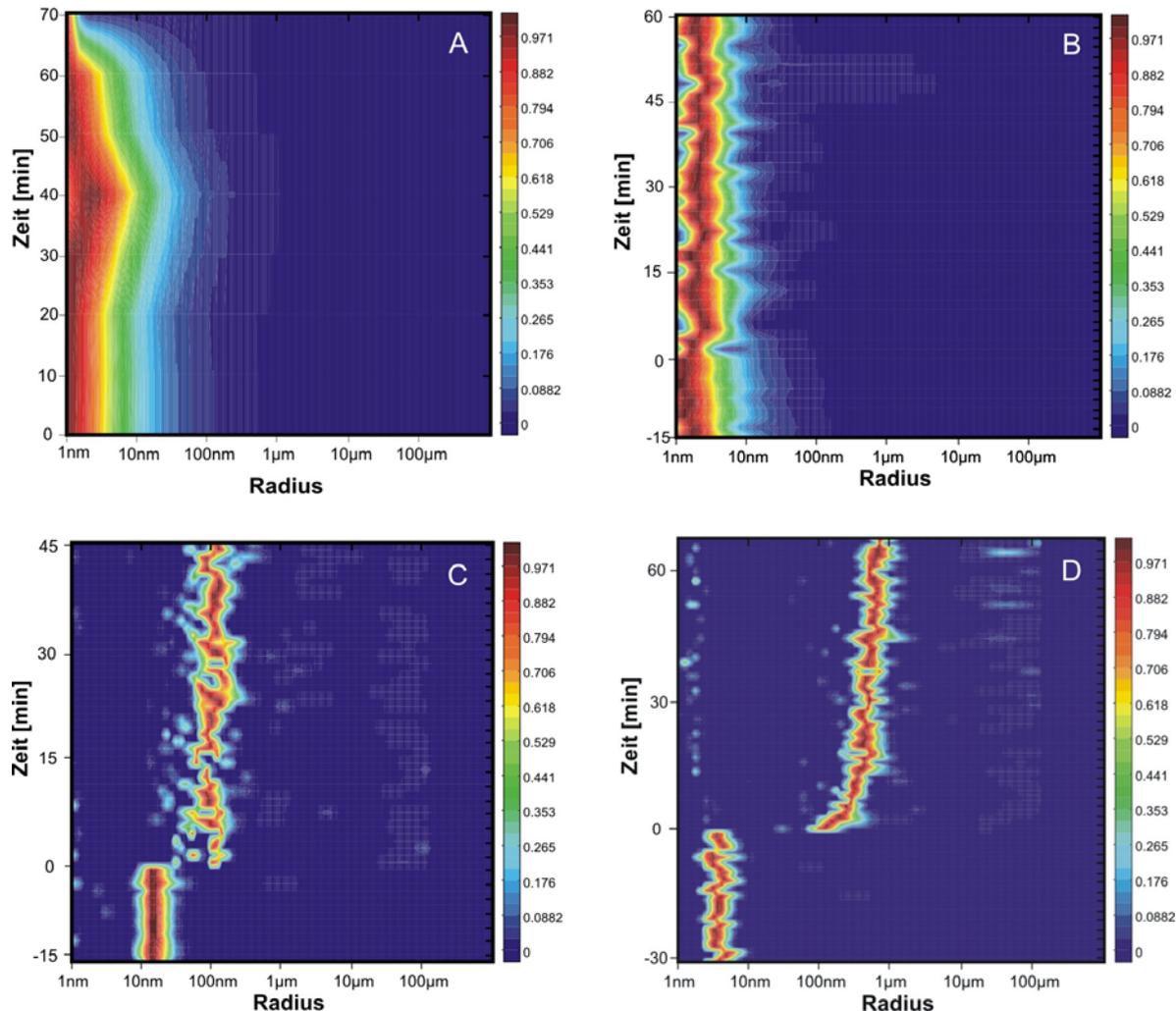


Abbildung 4-37: Einfluss von RNA auf das Aggregationsverhalten von PrP-Oligomer, PrP^C bzw. BSA. Mittels DLS wurde das Aggregationsverhalten der Proteine detektiert und in einer zwei-dimensionalen Grafik dargestellt, wobei die Zeit gegen die Molekülgröße aufgetragen ist. Die unterschiedlichen Farben geben die Intensität des Peaks an. **A:** 35 µM RNA wurde über einen Zeitraum von 70 min gemessen. **B-D:** 100 µM BSA (B), 30 µM PrP-Oligomer (C) bzw. 58 µM PrP^C (23-231) (D) wurden für 15-30 min im DLS vermessen. Bei 0 min erfolgte die Zugabe von RNA jeweils im Verhältnis Protein : RNA von 300 : 1. Das Verhalten der Proteine wurde für weitere 45-60 min aufgezeichnet.

Für die zelluläre Form des Prionproteins ergab sich ein ähnliches Bild. 58 µM PrP^C (23-231) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH = 5,0, konnten bei einem hydrodynamischen Radius von 3,6 nm beobachtet werden. Bei Zugabe von unselektierter Bibliothek wurde auch hier das

Signal zu höheren Radien verschoben. Sofort nach der Addition der RNA lag das Signal schon bei etwa 190 nm. Innerhalb von einer Stunde aggregierte das Protein zu Oligomeren mit stetig wachsendem Durchschnittradius von bis zu ungefähr 760 nm. Auch hier konnten Partikelgrößen im Mikrometer-Bereich (10-100 μm) gemessen werden, d. h. durch den Einfluss von RNA kam es zu massiven Aggregationen des Proteins, so dass die Aggregate schließlich so groß wurden, dass sie nicht mehr löslich waren und ausfielen. Alle Messungen wurden ebenso mit dem Aptamer S3-20 durchgeführt, die zu ähnlichen Ergebnissen führten.

