

9 Anhang

9.1 Sequenzen der verwendeten Bibliotheken und Primer

RNA-Bibliothek 1 (100-mer) und Primer

- 5'-d[GGGAATTCGAGCTCGGTACC-N₆₀-CTGCAGGCATGCAAGCTTGG]-3'
- Forward-Primer (37-mer)
5'-d[TAATACGACTCACTATAGGGAATTCGAGCTCGGTACC]-3'
- Reverse-Primer (20-mer)
5'-d[CCAAGCTTGCATGCCTGCAG]-3'

DNA-Bibliothek 2 (88-mer) und Primer

- 5'-d[GGTATTGAGGGTCGCATC-N₅₀-GATGGCTCTAACTCTCCTCT]-3'
- Forward-Primer (18-mer)
5'-d[GGTATTGAGGGTCGCATC]-3'
- Reverse-Primer (20-mer)
5'-d[AGAGGAGAGTTAGAGCCATC]-3'
- Reverse-Stopprimer (41-mer)
5'-d[A₂₀-HEGL-AGAGGAGAGTTAGAGCCATC]-3'
HEGL (Hexaethylenglycol) HOC₂H₄OC₂H₄OC₂H₄OC₂H₄OC₂H₄OC₂H₄OH

RNA-Bibliothek 3 (102-mer) und Primer

- 5'-d[GGGCGAATTGGGTACCGCATCC-N₆₀-GAATTCAGCAGGATCCGCCC]-3'
- Forward-Primer (40-mer)
5'-d[CTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGCATCC]-3'
- Reverse-Primer (20-mer)
5'-d[GGGCGGATCCTGCAGAATTC]-3'

RNA-Bibliothek 4 (71-mer) und Primer

- 5'-d[GGGAGGACGATGCGG-N₄₀-CAGACGACTCGCCCGA]-3'
- Forward-Primer (32-mer)
5'-d[TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG]-3'
- Reverse-Primer (16-mer)
5'-d[TCGGGCGAGTCGTCTG]-3'

Primer für die Sequenzierung

- Forward-Primer pUC (24-mer)
5'-CCGCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Verkürzungsvarianten V1 und V2 des Aptamers S3-20 mit Primern

- S3-20_V1 (61-mer)
5'-GGGAGCGGTCTGGTGAATTTGTTCCCTCGCTGGTTTAGGTCCAGCGCCTGACTGTACTCCC-3'
- Forward-Primer V1 (39-mer)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGAGCGGTCTGGTGAATTTG-3'
- Reverse-Primer V1 (20-mer)
5'-GGGAGTACAGTCAGGCGCTG-3'
- S3-20_V2 (53-mer)
5'-GGCGGTCTGGTGAATTTGTTCCCTCGCTGGTTTAGGTCCAGCGCCTGACCGCC-3'
- Forward-Primer V2 (40-mer)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGCGGTCTGGTGAATTTGTTCC-3'
- Reverse-Primer V2 (20-mer)
5'-GGCGGTCAGGCGCTGGACCT-3'

9.2 Peptide

- Peptid 1: Biotin-Ahx-GGG-YYRRYYRYY
- Peptid 2: Biotin-Ahx-RPMMHFGNDWEDRYYRENMNRYP (maPrP 136-158)

9.3 PrP^C *Mesocricetus aureus* (Goldhamster) 1-254

MANLSYWLLA LFMVAMWTDVG LCKKRPKPGG WNTGGSRYPG OGSPGGNRYP POGGGTWGQP
 HGGGWGOPHG GGWOPHGGG WGOPHGGGWG OGGGTHNOWN KPSKPKTNMK HMAGAAAAGA
 VVGGLGGYML GSAMSRPMMH FGNDWEDRYY RENMNRYPNQ VYYRPVDOYN NONNFVHDCV
 NITIKOHTVT TTTKGENFTE TDIKIMERVV EOMCTTOYOK ESOAYYDGRR SSAVLFSSPP
 VILLISFLIF LMVG

Dargestellt ist die unprozessierte Primärstruktur des Prionproteins aus *mesocricetus aureus*. Die unterstrichenen Aminosäuren umfassen das prozessierte PrP^C (23-231). Die entscheidenden Aminosäuren für die Wahl des Peptids 1 sind blau, das Peptid 2 ist rot markiert.

9.4 einklonierte Sequenzen zur Überexpression des Prionproteins

9.4.1 Prnp *mesocriteus aureus* (90-231)

(über NdeI und BamH I kloniert)

```
GGTCAAGGAGGTGGCACCCACAATCAGTGGAAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAACCAACATGAAGCACATG
GCCGGCGCTGCTGCGGCAGGGGCCGTGGTGGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGGAGTGCCATGAGC
AGGCCCATGATGCATTTTGGCAATGACTGGGAGGACCGCTACTACCGTGAAAACATGAACCGCTACCCT
AACCAAGTGTATTACCGGCCAGTGGACCAGTACAACAACCAGAACAACCTTTGTGCACGATTGTGTCAAC
ATCACCATCAAGCAGCACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACGGAGACCGACATCAAG
ATAATGGAGCGCGTGGTGGAGCAGATGTGTACCACCCAGTATCAGAAGGAGTCCCAGGCCTACTACGAT
GGAAGAAGGTCCAGCGCG
```

9.4.2 Prnp *mesocriteus aureus* (23-231)

(über BamH I und EcoR I kloniert)

```
GGATCCGGAAGGGGAAAGAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGTGGAAACACTGGCGGAAGCCGATACCCTGGG
CAGGGCAGCCCTGGAGGCAACCGTTACCCACCTCAGGGTGGCGGCACATGGGGGCAACCCCATGGTGGT
GGCTGGGGACAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGT
GGTGGCTGGGGTCAAGGAGGTGGCACCCACAATCAGTGGAAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAACCAACATG
AAGCACATGGCCGGCGCTGCTGCGGCAGGGGCCGTGGTGGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGGAGT
GCCATGAGCAGGCCCATGATGCATTTTGGCAATGACTGGGAGGACCGCTACTACCGTGAAAACATGAAC
CGTACCCTAACCAAGTGTATTACCGGCCAGTGGACCAGTACAACAACCAGAACAACCTTTGTGCACGAT
TGTGTCAACATCACCATCAAGCAGCACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACGGAGACC
GACATCAAGATAATGGAGCACGTGGTGGAGCAGATGTGTACCACCCAGTATCAGAAGGAGTCCCAGGCC
TACTACGATGGAAGAAGTCCCTGAGAATTC
```

9.5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	LMW	low molecular weight
Ac	Acetat	LNA	locked nucleic acid
Ahx	Aminohexansäure	ma	mesocriteus aureus
alk.	alkalisch	mind.	mindestens
Amp	Ampicillin	MMLV	moloney murine leukemia virus
AMV	avian myeloblastosis virus	MP	magnetische Partikel
Aq. Bidest.	Bidestilliertes Wasser	MRI	magnetic resonance imaging
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MRW	mean residue weight
AS	Aminosäure	MWCO	molecular weight cut off
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	N	Nucleotid
BIA	Bimolekulare Interaktionsanalyse	NMR	nuclear magnetic resonance
bp	Basenpaare	nt	Nucleotid
BSA	bovine serum albumin	NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
BSE	bovine spongiform encephalopathy	OD	optische Dichte
C	Cytidin	PAA	Polyacrylamid
CWD	chronic wasting disease	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
CD	Circulardichroismus	PBS	Phosphate buffered saline
cDNA	complementary DNA	pCp	Cytidin-3'-[5'- ³² P]-diphosphats
CIP	calf intestine phosphatase	PCR	polymerase chain reaction
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease	PDB	Proteindatenbank
	s = sporadisch, f = familiär,	PK	Proteinase K
	i = iatrogen, nv = neue Variante	Prnp	Prion-Protein-Gen beim Tier
CSF	Cerebrospinal Flüssigkeit	PrP ²⁷⁻³⁰	PK resistenter Teil von PrP ^{Sc}
CTP	Cytidin-5'-triphosphat	PrP ^C	rekombinates zelluläres
denat.	denaturierend	Prionprotein	
DLS	Dynamic Light Scattering	PrP ^{Sc}	Scrapie-Form des Prionprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid	RKI	Robert-Koch-Institut
dNTP	2'-Desoxyribonucleosidtriphosphat	RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid	RNase	Ribonuklease
ds	doppelsträngig	RT	reverse Transkription
DTT	Dithiothreitol	SA	Streptavidin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	sodium dodecyl sulfate
EEG	Elektroenzephalographie	SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	SPA	Scintillation Proximity Assay
EtOH	Ethanol	SPR	Surface Plasmon Resonance
EUE	exotic ungulate encephalopathy	T	Thymidin
FCS	Konfokal Dualfarben Fluoreszenz	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	Korrelationspektroskopie	TBE	Tris/Borsäure/EDTA
FFI	Fatale Familiäre Insomnie	TBS	Tris buffered saline
FSE	feline spongiform encephalopathy	TE	Tris/EDTA
FTIR	Fourier-Transformation	TEMED	N,N,N',N'-
	Infrarotspektroskopie		Tetramethylethylendiamin
G	Guanosin	TME	transmissible mink encephalopathy
geb.	gebunden	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol	TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathy
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker (-Syndrom)	U	Uridin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	ün	über Nacht
HBS-P	Hepes buffered saline Puffer	UTP	Uridin-5'-triphosphat
HEGL	Hexaethylenglycol	UV	ultraviolett
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure	UZ	Ultrazentrifuge
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	V	Volumen
IPTG	Isopropylthiogalactosid	verd.	Verdünnung
kb(p)	Kilobasen(paare)	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante	ZA	Zählausbeute
LB	Luria-Bertani-(Medium)	ZNS	zentrales Nervensystem
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie		

9.6 Physikalische Einheiten

A	Ampere	h	Stunde
Bq	Bequerel (= 1 Zerfall pro s)	l	Liter
C	Celsius	M	molar (mol/l)
c	Konzentration	m	Meter
cal	Kalorie	min	Minute
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^6$ Bq)	Mol	$6,023 \times 10^{23}$ Teilchen
cpm	<i>counts per minute</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
Da	Dalton	RU	<i>resonance units</i>
dpm	<i>desintegrations per minute</i>	s	Sekunde
E	Extinktion	u	Unit, Einheit der Enzymaktivität
ϵ	spezifischer Extinktionskoeffizient	v/v	Volumen pro Volumen
g	Gramm	w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Gravitation, Erdbeschleunigung	V	Volt

9.7 Präfixe für Einheiten

p	Pico (10^{-12});
n	Nano (10^{-9});
μ	Mikro (10^{-6});
m	Milli (10^{-3});
k	Kilo (10^3)

Weiterhin wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

9.8 Eigene Veröffentlichungen

Piet-Jan Sinnema, Pamela J. Shapiro, Britta Höhn, Thomas E. Bitterwolf and Brendan Twamley (2001) Calcium Mediated Fulvene Couplings. 1. A Survey of 6,6'-Dialkylfulvenes for the Formation of Bridged and Unbridged Calcocenes. *Organometallics*, **20**, 2883-2888.

Piet-Jan Sinnema, Britta Höhn, Robert L. Hubbard, Pamela J. Shapiro, Brendan Twamley, Alexander Blumenfeld and Ashwani Vij (2002) Calcium Mediated Fulvene Couplings. 2. Survey of 6-Aryl- and 6-Alkylfulvenes for their *rac* Selectivity in the Synthesis of ansa-Calcocenes. *Organometallics*, **21**, 182-191.

Susanne Angelow, Britta Höhn, Patrick Zeni and Hans-Joachim Galla (2005) Phorbol ester induced short- and long-term permeabilization of the blood-CSF barrier *in vitro*: correlation with modifications of tight junctions, matrix metalloproteinase secretion and the actin cytoskeleton, *Brain Research*, **1063**(2), 168-79.

Britta Höhn, Karol Szkaradkiewicz, Christian Betzel, Marcus Menger, Jens P. Fürste and Volker A. Erdmann, Generating aptamers against a peptide derived from the prion protein. Manuskript in Vorbereitung

Poster

Britta Höhn, Susanne Angelow and Hans-Joachim Galla: Regulation of tight junction permeability at blood-CSF-barrier *in vitro*. 5th symposium "Signal transduction in the blood-brain-barrier", 22-24 September, 2002, Potsdam, Germany

Britta Höhn, Karol Szkaradkiewicz, Jens P. Fürste, and Volker A. Erdmann: Generating aptamers against the prion protein. Summer School "Protein Misfolding, Protein Modification and Age-Related Diseases", 5-15 September, 2005, Spetsai, Greece

Britta Höhn, Karol Szkaradkiewicz, Marcus Menger, Jens P. Fürste, and Volker A. Erdmann: Generating aptamers against a peptide derived from the prion protein. GBM-Meeting, 18-21 September, 2005, Berlin, Germany

9.9 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Volker A. Erdmann für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit, den zugestandenen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas, die stetigen Ermunterungen und die vielfältigen Möglichkeiten zu Weiterbildungen und Präsentationen.

Dr. Jens Peter Fürste danke ich aufrichtig für die Betreuung meiner Arbeit mit maßgeblichen Hinweisen und Ratschlägen in jeder Lebenslage.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerd Multhaupt möchte ich mich für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Michael Baier und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Kooperation und Unterstützung am Robert-Koch-Institut. Besonders bin ich Frau Sibill Lichy für die Präparation von PrP^{Sc} und Frau Karin Krohn für die experimentelle Hilfe bei dem ELISA zu Dank verpflichtet.

Prof. Dr. Dr. Christian Betzel und Dr. Lars Redecke danke ich herzlich für die mühevollen Bereitstellung des PrP-Oligomers und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Rudi Lurz für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, Christian Jäckel für die Ausführung der RP-HPLC, Maxim Rossokha für die freundliche Einweisung in die Methodik von CD-Spektroskopie und DLS sowie Dr. Marcus Menger für die Unterweisung in Biacore-Messungen und kompetente Anregungen.

Zu großem Dank bin ich der gesamten Arbeitsgruppe für die entspannte Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft in allen Situationen verpflichtet. Besonders möchte ich Dr. Karol Szkaradkiewicz für die angenehme Zusammenarbeit im gemeinsamen Labor, Svenja Brode und Frank Kuppler für die tatkräftige Unterstützung bei der Proteinreinigung, Dr. Arnd Brauer für das Korrekturlesen des Manuskripts und die zahlreichen strategischen Ratschläge sowie Dr. Andreas Zerressen-Harte für den Nachschub an Literatur danken.

Von Herzen danke ich Dr. Marco Vallazza für die endlose Geduld, den Rückhalt und die immerwährende Motivation, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders möchte ich mich bei Frau Ute Klentz für ihre andauernde und vertrauensvolle Freundschaft bedanken.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind. Ihre Unterstützung und ihre Ermutigungen haben mir meinen bisherigen Weg geebnet und erleichtert.