

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Neuropeptid Y- und Prionprotein- spezifische Aptamere:
Selektion, Charakterisierung und biologische Funktion

von
Daniela Proske

aus
Sangerhausen

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 29.3. 2001

(Daniela Proske)

Dissertation eingereicht am	30.3.2001
1. Gutachter	Prof. E.-L. Winnacker
2. Gutachter	Prof. M. Famulok
Mündliche Prüfung am	20.6. 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1996 bis September 2000 am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine Unterstützung, die er mir im Verlauf der gesamten Dissertation zuteil werden ließ. Ich danke ihm weiterhin für die Möglichkeit an zahlreichen internationalen und nationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Genzentrum.

Herrn Prof. Dr. M. Famulok möchte ich für die unkomplizierte Aufnahme in seine RNA-Arbeitsgruppe, in der ich zwei Jahre lang sowohl die Methode der in vitro Selektion als auch die umfassende Charakterisierung von RNA-Aptameren erlernte, ganz herzlich danken. Weiterhin danke ich ihm für seine zahlreichen Ideen und konstruktiven Diskussionsbeiträge.

Bei allen Mitgliedern der Prion-Arbeitsgruppe (Dr. Frank Edenhofer, Evelyn Fisch, Dr. Roman Rieger und Dr. Stefan Weiss) bedanke ich mich für die Einführung in die Prionen-Problematik, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bei der Bewältigung des ersten Teils meiner Doktorarbeit.

Den Mitgliedern der RNA-Arbeitsgruppe (Dr. Michael Blind, Christian Huber, Dr. Andreas Jenne, Günter Mayer, Dr. Nicolas Piganeau, Nikolai Raffler, Gerhard Sengle und Carol Zehetmeier) danke ich herzlich für die beständige Hilfsbereitschaft, die nützlichen Ratschläge und das freundliche Arbeitsklima insbesondere meinen treuen Wegbegleitern Dr. Michael Blind und Dr. Andreas Jenne.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Herrmann Schätzl und Sabine Gilch für die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Konversionsstudien sowie ihre fortwährende Motivation und Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Anette Beck-Sickinger bedanke ich mich für ihre sehr hilfreichen Diskussionen bei der Durchführung der Kompetitionsstudien an unterschiedlichen NPY-Rezeptoren in ihrer Arbeitsgruppe. Herrn Richard Söll danke ich für die Synthese der NPY-Analoga und der ganzen Leipziger-Gruppe für die sehr

freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz großen Dankeschön geht an Siegi Kastenmüller und ihre immer reibungslose und zuverlässige Bewältigung der bürokratischen Aufgaben. Bei Dr. Heike Buhmann, Dr. Michael Blind, Dr. Anne Girod, Dr. Ansgar Resch, Dr. Herrmann Schätzl, Christian Spielhauer und Franziska Wopfner bedanke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für die fortwährende und liebevolle Unterstützung, die sie mir während meiner gesamten Ausbildung zukommen ließen.

Folgende Veröffentlichungen sind im Verlauf der Dissertation entstanden bzw. noch in Vorbereitung:

Weiss, S., Edenhofer, F., Rieger, R., Proske, D., Famulok, M., Fisch, E., Winnacker, E.-L., Molecular chaperones and RNA aptamers as interactors for prion proteins. In: Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Diseases. L. Court, B. Dodet (eds.) 1996, Elsevier, Paris, p. 331-338.

Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H. A., Famulok, M. und Winnacker, E.-L., RNA Aptamers Specifically Interact with the Prion Protein PrP. In: Journal of Virology, 1997, p. 8790-8797

Europäische Patentanmeldung 62653A1: Nucleic acid molecules capable of distinguishing the isoforms PrP^C and PrP^{Sc} of Prion Proteins and processes for their production

Tittmann, K., Proske, D., Spinka, M., Ghisla, S., Rudolph, R., Hubner, G., Kern, G., Activation of thiamin diphosphate and FAD in the phosphatedependent pyruvate oxidase from Lactobacillus plantarum. In: J Biol Chem, 1998, 273(21):12929-34

Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schätzl, H., Winnacker, E.-L. und Famulok, M., Manuskript angenommen in ChemBioChem: Prion-specific aptamer reduces Prp^{res}-formation

Proske, D., Höfliger, M., Söll, R. M., Beck-Sickinger, A. und Famulok, M., A Y2 receptor mimetic aptamer directed against neuropeptide Y. In: J Biol Chem, 2002, 277 (13): 11416-22

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	APTAMERE	1
1.1.1	Evolution.....	1
1.1.2	"Evolution im Reagenzglas"	1
1.1.3	Anwendungspotential der Aptamere.....	4
1.1.4	Aptamere und monoklonale Antikörper in Vergleich	7
1.2	DAS NEUROPEPTID Y (NPY)	9
1.2.1	Struktur und Funktion von NPY.....	10
1.2.2	Neuropeptid Y-Rezeptoren.....	11
1.2.3	Charakterisierung der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung.....	12
1.2.4	Der Y1-Rezeptor	14
1.2.5	Der Y2-Rezeptor	14
1.2.6	Der Y5-Rezeptor	15
1.3	DAS PRIONPROTEIN	17
1.3.1	Prionerkrankungen - ein historischer Abriß.....	17
1.3.2	Prionerkrankungen des Menschen.....	17
1.3.3	BSE - Übertragbarkeit auf den Menschen ?	19
1.3.4	Transgene Tiermodelle und Speziesbarriere	20
1.3.5	Das Prionprotein (PrP)	21
1.3.6	Primär- und Tertiärstruktur des Prionproteins	23
1.3.7	Die physiologische Funktion des Prionproteins	25
1.3.8	Die Replikation des Prionproteins.....	27
1.3.9	Das Virino-Modell.....	28
1.3.10	Die Heterodimer Hypothese oder das Protein-Only-Modell.....	29
1.3.11	Das kernabhängige Polymerisations-Modell	31
1.4	AUFGABENSTELLUNG	32
2	Material	33
2.1	GERÄTE UND MATERIALIEN	33
2.2	CHEMIKALIEN.....	34
2.3	STANDARDS UND KITS	36
2.4	ENZYME UND PROTEINE	37
2.5	SÄULENMATERIAL	37

Inhaltsverzeichnis

2.6	NUKLEOTIDE UND RADIOCHEMIKALIEN	37
2.7	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	38
2.8	PEPTIDE	39
2.9	PLASMIDE.....	40
2.10	BAKTERIEN.....	41
2.11	ZELLINIEN.....	41
3	Methoden.....	42
3.1	KLONIERUNGSMETHODEN.....	42
3.1.1	<i>Plattenkultur</i>	42
3.1.2	<i>Flüssigkultur</i>	42
3.1.3	<i>Glycerinkultur</i>	43
3.1.4	<i>Herstellung transformationskompetenter Bakterien</i>	43
3.1.5	<i>Transformation von E. coli</i>	44
3.1.6	<i>Isolierung von Plasmiden aus E. coli</i>	44
3.2	ARBEITSTECHNIKEN IM UMGANG MIT NUKLEINSÄUREN.....	44
3.2.1	<i>Analytische Trennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren</i>	44
3.2.2	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	45
3.2.3	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	46
3.2.4	<i>Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen</i>	47
3.3	PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	48
3.3.1	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	48
3.3.2	<i>Ethanol-Präzipitation</i>	48
3.3.3	<i>Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelfiltration</i>	49
3.3.4	<i>Übertragung von RNA auf Nylonmembranen</i>	49
3.3.5	<i>Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen</i>	50
3.3.6	<i>Amplifikation und enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren</i>	50
3.3.7	<i>In vitro Transkription von 2'-Hydroxy-RNA</i>	52
3.3.8	<i>In vitro Transkription von 2'-modifizierter RNA</i>	53
3.3.9	<i>Restriktionshydrolyse doppelsträngiger DNA</i>	54
3.3.10	<i>Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase</i>	54
3.3.11	<i>Ligation von doppelsträngiger DNA</i>	55
3.3.12	<i>5'-Dephosphorylierung von RNA</i>	55
3.3.13	<i>Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA</i>	55

Inhaltsverzeichnis

3.3.14	Markierung von GMPS-geprimter RNA mit Fluorescein	56
3.3.15	DNA-Sequenzierung	56
3.4	ALLGEMEINE METHODEN ZUR PROTEINANALYSE	58
3.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	58
3.4.2	Fällen von Proteinen	58
3.4.3	SDS-Gelelektrophorese.....	59
3.4.4	Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen	60
3.4.5	Western Blot.....	60
3.4.6	Expression und Reinigung von GST-Fusionspeptiden in <i>E. coli</i>	62
3.4.7	Reinigung über Glutathionsepharose	62
3.5	ANALYSE VON RNA-PROTEIN/PEPTID-KOMPLEXEN	63
3.5.1	Analytische Filterbindungsassays.....	63
3.5.2	Immobilisierung von Peptiden.....	64
3.5.3	Analyse von RNA-Protein/Peptid-Komplexen durch native Agarosegelelektrophorese.....	65
3.5.4	Gel-Retardation von zellulärem Prionprotein aus Hirnhomogenaten.....	66
3.5.5	Bestimmung der Dissoziationskonstanten eines selektierten Aptamers durch analytische Affinitätschromatographie	68
3.6	ARBEITSTECHNIKEN IM UMGANG MIT ZELLINIEN.....	69
3.6.1	Präparation von PrP ^{Sc} aus Scrapie infizierten Neuroblastomzellen (N ₂ a-Zellen).....	71
3.6.2	Kompetition der Bindung von NPY an seine Rezeptoren durch NPY-Aptamere auf Zellen	72
3.6.3	In vitro Konversion.....	73
3.6.4	Analyse des de novo synthetisierten PrP ^{Sc} 's aus Scrapie infizierten Neuroblastomzellen.....	74
3.7	IN VITRO SELEKTION.....	75
3.7.1	Die in vitro Selektion am Neuropeptid Y.....	76
3.7.2	Selektion von Prionpeptid 90-129-spezifischen Aptameren.....	78
4	Ergebnisse	79
4.1	IN VITRO SELEKTION.....	79
4.2	IN VITRO SELEKTION VON NEUROPEPTID Y (NPY) SPEZIFISCHEN RNA-MOLEKÜLEN UND DEREN FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG.....	81
4.2.1	Der Verlauf der in vitro Selektion.....	81
4.2.2	Die Bindung des selektierten Pools an NPY.....	86
4.2.3	Klonierung und Sequenzierung des selektierten Pools.....	87
4.2.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten individueller Sequenzen an NPY durch Nitrozellulosefilterbindungsstudien	89

Inhaltsverzeichnis

4.2.5	Spezifität von DP3 innerhalb der Pankreatischen Polypeptidfamilie.....	90
4.2.6	Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Aptamers DP3 an NPY durch analytische Affinitätschromatographie	92
4.2.7	Stabilität der 2'-Amino-2'-deoxy Nukleinsäuren.....	93
4.2.8	Die Identifizierung der minimalen Aptamer-Bindungsstelle an NPY.....	94
4.2.9	Die Interaktion von Aptamer DP3 mit spezifischen NPY-Rezeptor Agonisten	97
4.2.10	Die selektive Inhibition der NPY/NPY-Rezeptorinteraktion durch DP3.....	97
4.3	CHARAKTERISIERUNG VON PRIONPROTEIN SPEZIFISCHEN APTAMEREN.....	101
4.3.1	Die Aptamer-Sequenzmotive und deren spezifische Wechselwirkung mit dem rekombinanten GST::PrP23-231.....	101
4.3.2	Identifizierung der Interaktionsdomäne innerhalb von PrP ^C in vitro.....	106
4.3.3	Spezifische Interaktion der RNA-Aptamere mit endogenem Prionprotein aus Gehirnhomogenaten verschiedener Spezies	108
4.3.4	Vergleich der Aptamer-PrP-Interaktion in Gehirnhomogenaten nicht infizierter (PrP ^C) und infizierter (PrP ^{Sc}) Mäuse.....	112
4.4	IN VITRO SELEKTION VON RNA-MOLEKÜLEN AN EINER AUSGEWÄHLTEN REGION DES HUMANEN PRIONPROTEINS (AS 90-129) UND DEREN FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	115
4.4.1	Das Vorgehen bei der in vitro Selektion.....	116
4.4.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten individueller Sequenzen durch Nitrozellulosefilterbindungsstudien am Prionprotein.....	123
4.4.3	Einfluß der Aptamere auf die Biogenese und Akkumulation von hochmolekularen PrP ^{Sc} -Molekülen in Prion-infizierten Neuroblastomzellen	125
5	Diskussion.....	132
5.1	DIE SELEKTION UND IN VITRO CHARAKTERISIERUNG VON NPY-SPEZIFISCHEN APTAMEREN	132
5.2	DIE PRIONPROTEIN-SPEZIFISCHEN APTAMERE	143
5.3	DIE PRIONPEPTID-SPEZIFISCHEN APTAMERE	148
6	Zusammenfassung	154
7	Anhang.....	157
8	Literaturverzeichnis	158

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	"Arginine Rich Motif"
AS	Aminosäure
bFGF	"basic fibroblast growth factor"
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
CD18cyt	zytoplasmatische Domäne der CD18-Intergrinuntereinheit
Ci	Curie
CIAP	alkalische Phosphatase
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

hPP	Humanes Pankreatisches Polypeptid
hTSH	"human thyroid stimulating hormone"
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KGF	"keratinocyte growth factor"
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute
mM	millimolar
NaOAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NPY	Neuropeptid Y
NTP	Nukleotid-5'-triphosphat
nv CJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	"Phosphat Buffered Saline"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	"platelet derived growth factor"
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
pmol	picomol
PrP	Prionprotein
PrP ^c	zelluläre Form des Prionproteins
PrP ^{res}	Proteinase K-resistente Form des Prionproteins
PrP ^{Sc}	pathogene Form des Prionproteins (Sc=Scrapie)
RNA	Ribonukleinsäure
RBE	"Rev Binding Element"
RRE	"Rev Responsive Element"
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SELEX	"Systematic Evolution of Ligands by Eponential Enrichment"
sog.	sogenannte
SV	Säulenvolumen
TSE	Transmissible Spongiform Enzephalopathie
U	Unit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VEGF	"vascular endothelial growth factor"
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
Y1	NPY-Rezeptorsubtyp 1
Y2	NPY-Rezeptorsubtyp 2
Y5	NPY-Rezeptorsubtyp 5
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

- 1.1 Aptamere
- 1.2 Das Neuropeptid Y(NPY)
- 1.3 Das Prionprotein
- 1.4 Aufgabenstellung

1.1 Aptamere

1.1.1 Evolution

Mit seinem Werk "On the Origin of Species" hat Charles Darwin (1809-1882) nicht nur Indizien für den phylogenetischen Zusammenhang der Organismen aufgeführt, sondern in sich schlüssige, kausale Erklärungen des Evolutionsprozesses vorgelegt. Evolution bedeutet, daß sich der Genbestand einer Art in der Generationsfolge ändert und diese Änderung in einer Weise erfolgt, daß die Träger dieser Gene jeweils optimal in ihre ökologische Nische angepaßt sind. Die Frage nach den Mechanismen der Evolution wurde von Darwin in der in ihren wesentlichen Zügen bis heute gültigen Selektionstheorie beantwortet. Bei der Formulierung der Selektionstheorie ging Darwin von zwei entscheidenden Befunden aus: Erstens erzeugen alle Organismen weit mehr Nachkommen, als bei den begrenzten natürlichen Ressourcen überleben können (ökologische Konkurrenz). Zweitens stimmen diese Nachkommen nicht völlig mit ihren Eltern überein, sondern unterscheiden sich sowohl von diesen als auch untereinander. Darwin folgerte aus den beiden Befunden: Durch natürliche Auslese (Selektion) werden im "struggle for life" jeweils die am besten angepaßten unter den genetisch unterschiedlichen Individuen überleben und ihre Gene in die nächste Generationsfolge einbringen. In der Generationsfolge führt dieser Prozeß zu fortwährender genetischer Änderung von Populationen- zur Evolution (Steinmüller, 1985), (Wehner und Gehring, 1992).

1.1.2 "Evolution im Reagenzglas"

Nukleinsäuren sind nicht nur Träger der genetischen Information, sie besitzen auch die Fähigkeit zur Ausbildung von definierten Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen (Famulok *et al.*, 2000). Die dreidimensionale Faltung (Phänotyp)

Einleitung

einzelsträngiger RNA-Moleküle wie auch die genetische Information (Genotyp) werden durch die Primärsequenz der Nukleinsäure bestimmt (Gold *et al.*, 1995). Die Eigenschaft, komplexe Strukturen auszubilden machte man sich zu nutze, um Aptamere (abgeleitet aus dem Lateinischen "aptus"=passend), als spezifische Interaktoren für eine Vielzahl von Bindungspartnern mit Hilfe der *in vitro* Selektion zu isolieren (Ellington und Szostak, 1990), (Tuerk und Gold, 1990).

Die "Evolution im Reagenzglas" oder *in vitro* Selektion erfolgt nach dem Darwinschen Prinzip: 1.) der Erzeugung der Sequenzvielfalt (Mutation), 2.) die Selektion bestimmter phänotypischer Eigenschaften (Auslese) und 3.) Amplifikation der selektierten Moleküle (Vermehrung). Seit ihrer Entwicklung im Jahre 1990 hat sich die *in vitro* Selektionstechnologie, die oft als **SELEX** (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential Enrichment) bezeichnet wird, als hilfreiches Werkzeug in der Molekularbiologie und Biotechnologie etabliert und hält gegenwärtig Einzug in diagnostische und therapeutische Verfahren (Osborne *et al.*, 1997), (Famulok, *et al.*, 2000).

Ausgangsbasis eines *in vitro* Selektionsexperiments ist eine Zufallsbibliothek bestehend aus ssRNA, ssDNA oder chemisch modifizierten, einzelsträngigen Nukleinsäuren. Diese Bibliothek wird einem geeigneten Selektionsprozess in Gegenwart des Zielmoleküls unterzogen, in welchem funktionelle von nicht funktionellen Nukleinsäuren abgetrennt werden. Die mit dem Zielmolekül interagierenden Aptamere werden anschließend vervielfältigt und wiederholten Selektionszyklen unterzogen. Dies ist erforderlich, da die Komplexität der Bibliothek, die bis zu 10^{16} individueller Sequenzen umfassen kann, eine Anreicherung bindender Nukleinsäuren in einem Selektions- bzw. Amplifikationsschritt nicht zulässt. Es werden daher mehrere Zyklen iterativ durchlaufen, bis die funktionellen Sequenzen in der Bibliothek dominieren, aus der sie dann kloniert, sequenziert und charakterisiert werden können (Klug und Famulok, 1994).

Das Spektrum der Zielstrukturen von Aptameren reicht von Metallionen und kleinen organischen Verbindungen, Aminosäuren und Cofaktoren (Famulok, 1999) über Proteine und Peptide bis hin zu komplexen Strukturen wie Viren und einzelligen Organismen (Pan *et al.*, 1995), (Homann und Goringe, 1999), (Osborne, *et al.*,

Einleitung

1997). Aptamere können per se gegen nukleinsäurebindende Liganden als auch gegen Liganden, die natürlicherweise nicht mit Nukleinsäuren assoziiert sind, selektiert werden. In Tabelle 1 ist eine Auswahl von Aptameren und dem dazugehörigen Zielmolekül zusammengestellt:

Zielmolekülgruppe	Selektionstarget	Aptamer	Kd	Literaturangabe
Metallionen	Nickel	RNA	1 μ M	(Hofmann <i>et al.</i> , 1997)
Nukleotide	FMN	RNA	500 nM	(Burgstaller und Famulok, 1994)
	AMP	DNA	6 μ M	(Huizenga und Szostak, 1995)
Aminosäuren	Arginin	DNA	125 μ M	(Harada und Frankel, 1995)
	Citrullin	RNA	65 μ M	(Famulok, 1994)
Aminoglykoside	Tobramycin	RNA	12 nM	(Wang und Rando, 1995)
	Neomycin	RNA	115 nM	(Wallis <i>et al.</i> , 1995)
Peptide	Rev-Peptid	RNA	20 nM	(Xu und Ellington, 1996)
	Vasopressin	L-DNA	900 nM	(Williams <i>et al.</i> , 1997)
	SubstanceP	RNA	190 nM	(Nieuwlandt <i>et al.</i> , 1995)
	K-Ras-Peptid	RNA	140 nM	(Gilbert <i>et al.</i> , 1997)
	CD 18	RNA	500 nM	(Blind <i>et al.</i> , 1999)
Physiologisch Nukleinsäure-bindende Proteine	HIV-Rev	RNA	1 nM	(Giver <i>et al.</i> , 1993)
	MS2 Coat Protein	RNA	n.b.	(Convery <i>et al.</i> , 1998)
	HTLV-1Rex	RNA	n.b.	(Baskerville <i>et al.</i> , 1995)
Nicht physiologisch Nukleinsäure-bindende Proteine	VEGF	2' mod. RNA	0,14 nM	(Green <i>et al.</i> , 1995)
	Human Thrombin	DNA	25 nM	(Bock <i>et al.</i> , 1992)
	L-Selectin	DNA	1,8 nM	(Hicke <i>et al.</i> , 1996)
	PDGF	DNA	0,1 nM	(Green <i>et al.</i> , 1996)
Komplexe Strukturen	Trypanosomen	RNA	60 nM	(Homann und Goring, 1999)
	RSV	2' mod. RNA	> 40 nM	(Pan, <i>et al.</i> , 1995)

Einleitung

Tabelle 1 Beispiele für Aptamere und ihre Zielmoleküle: VEGF = vascular endothelial growth factor, PDGF = platelet derived growth factor, FMN = Flavinmononukleotid, HIV = human immune deficiency virus, HTLV = human T-cell leukemia virus, AMP = Adenosinmonophosphat, RSV = rous sarkom virus

1.1.3 Anwendungspotential der Aptamere

Antikörper gehören zu den Standardwerkzeugen in vielen Bereichen der Forschung, Diagnostik und Therapie. Hochaffine und spezifische Aptamere (vgl. Tab.1) sind zu einer potenten Alternative zu monoklonalen Antikörpern (mAK) entwickelt worden.

1.1.3.1 Aptamerspezifität

Eines der beeindruckendsten Beispiele vor allem im Hinblick auf die diagnostische Anwendung ist das Theophyllin-Aptamer mit einer Dissoziationskonstante von 320 nM (Jenison *et al.*, 1994). Der Selektionsprozess wurde von Jenison und Mitarbeitern so gestaltet, daß die Nukleinsäureliganden ihr Zielmolekül Theophyllin etwa 10000-fach besser binden als das strukturverwandte Koffein, welches sich nur durch eine Methylgruppe am Stickstoff N-7 des Purinringes unterscheidet. Theophyllin, ein in der Natur vorkommendes Alkaloid, wird bei akuten Asthmaanfällen (Asthma bronchiale) verabreicht und zur Behandlung von chronischem Asthma und Bronchitis eingesetzt (Hendeles und Weinberger, 1983). Dabei muß die Konzentration im Serum genau überwacht werden, da Theophyllin einen geringen Abstand zwischen therapeutisch wirksamer und toxischer Dosis aufweist (niedrige therapeutische Breite). Erhebliche Probleme treten deshalb aufgrund inter- und intraindividuelle Schwankungen der Theophyllin Metabolisierung und Ausscheidung auf. Zudem werden die gemessenen Werte oft durch andere Methylxanthinderivate wie z.B. Koffein verfälscht. Von daher ist der Einsatz hochspezifischer Liganden zur Bestimmung der exakten Theophyllinkonzentration wichtig. Die bisher vorhandenen monoklonalen Theophyllin-Antikörper haben eine 1000-fach höhere Affinität zu Theophyllin als zu Koffein, binden aber im Vergleich zu den gegen Theophyllin selektierten Aptameren um eine Zehnerpotenz schlechter (Poncelet *et al.*, 1990).

Einleitung

1.1.3.2 Aptamerstabilität

Voraussetzung für die diagnostische oder therapeutische Applikation von Nukleinsäuren ist deren Stabilisierung gegenüber Nukleaseabbau (Jayasena, 1999). Zur Verbesserung der Nukleaseresistenz wurden unter anderem Spiegelbild-L-RNA Oligonukleotide entwickelt (Klussmann *et al.*, 1996), (Nolte *et al.*, 1996). Um Spiegelmere herzustellen, wird das Spiegelbild eines Zielmolekül bestehend aus D-Aminosäuren genutzt, um Aptamere aus dem natürlichen D-RNA Pool zu selektieren. Nach erfolgreicher Selektion werden die korrespondierenden L-RNA-Aptamere synthetisiert und können das natürliche aus L-Aminosäuren bestehende Zielmolekül binden. Aufgrund der Stereoselektivität werden die L-Ribose enthaltenden Aptamere von Nukleasen nicht als Substrat erkannt. Die Spiegelmertechologie wurde bisher nur bei kleinen Molekülen wie L-Arginin (Nolte, *et al.*, 1996) und D-AMP (Klussmann, *et al.*, 1996) und dem Peptid L-Vasopressin (Williams, *et al.*, 1997) erfolgreich durchgeführt.

Ein zweiter Ansatz zur Verbesserung der Ribonukleaseresistenz der Aptamere ist die Substitution der 2' OH-Gruppe der Pyrimidine durch Amino- oder Fluorgruppen. Diese derart modifizierten RNA-Bausteine sind in den Selektionsprozess unter Standardbedingungen integrierbar und fanden bereits breite Anwendung (Jellinek *et al.*, 1995), (Famulok, *et al.*, 2000). So wurde eine Reihe von 2' modifizierten Nukleinsäureliganden mit spezifischen Bindungsverhalten an Wachstumsfaktoren wie VEGF (Green, *et al.*, 1995), KGF (Pagratis *et al.*, 1997), bFGF (Jellinek, *et al.*, 1995), an Hormone wie das human thyroid stimulating hormone hTSH (Lin *et al.*, 1996) und Enzyme wie die humane neutrophile Elastase (Lin *et al.*, 1994) isoliert. Eine Stabilisierung der Aptamere nach Abschluß des Selektionsexperimentes ist durch den zusätzlichen Einbau von 2'-O-Methylgruppen (Gold, *et al.*, 1995) und terminalen Phosphothioaten (Heidenreich *et al.*, 1993) möglich. Durch die aufgeführten Modifikationen kann eine Verbesserung der Halbwertszeit im Vergleich zu unmodifizierten Nukleinsäureliganden bis zu mehreren Tage erzielt werden (Pagratis, *et al.*, 1997), (Brody *et al.*, 1999).

Die Fortschritte, welche im Hinblick auf die Stabilität von Nukleinsäureliganden erzielt wurden, machen deren Einsatz in Anwendungen, die bisher vor allem mit

Einleitung

monoklonalen Antikörpern durchgeführt wurden, möglich. So wurde beispielsweise in auf der Aptamer-Technologie basierender ELISA (ELONA) (Drolet *et al.*, 1996) eine Kapillarelektrophorese zur Quantifizierung von IgE (German *et al.*, 1998) und ein bildgebendes Verfahren zur Identifizierung von Entzündungsherden im Mausmodell (Charlton *et al.*, 1997) entwickelt.

Ferner wurden Biosensoren konstruiert, auf welchen Aptamere gekoppelt an ein Fluorophor ihr Zielmolekül (Thrombin) im attomolaren Bereich detektieren können (Potyrailo *et al.*, 1998). Da die relativ kleinen Oligonukleotide schnell über die Niere ausgeschieden werden, kann deren Molekülgröße zur Erhöhung der biologischen Halbwertszeit durch Verankerung in Liposomen oder durch die Kopplung an große Moleküle wie Polyethylenglykol (PEG) vergrößert werden (Ostendorf, 1999).

Der erste therapeutisch eingesetzte, stabilisierte Nukleinsäureligand, welcher bereits in klinischen Studien erprobt wird, ist das anti-human VEGF-Aptamer (*vascular endothelial growth factor*). VEGF-Überproduktion ist mit pathologischer Blutgefäßneubildung assoziiert, welche vor allem bei der Vaskularisierung und Proliferation von Tumoren bedeutsam ist. Der durch 2'-Fluoro-2'-Deoxypyrimidinbausteinen, 2'-Methoxypurinen und terminalen Phosphothioatgruppen stabilisierte RNA-Ligand (NX 1838) verhindert die Bindung von VEGF an humane Endothelzellen ($ED_{50} = 1 \text{ nM}$) und damit die VEGF-induzierte Zellproliferation (Bell *et al.*, 1999). Das anti-VEGF-Aptamer zeigte durch eine zusätzliche PEG-Gruppe eine verlängerte biologische Halbwertszeit und damit eine für therapeutische Anwendungen geeignetere Pharmakokinetik (Tucker *et al.*, 1999), (Willis *et al.*, 1998).

1.1.3.3 Aptamere - ein Werkzeug zur Aufklärung biologischer Funktionen

Aptamere in Komplex mit ihrem Zielmolekül können helfen physiologische Prozesse und intermolekulare Bindungen besser zu verstehen. Eine mit Hilfe der SELEX-Technologie untersuchte RNA-Protein-Wechselwirkung ist die Bindung des HIV-1 Rev-Proteins an das RRE (Rev responsive element). Durch die Verwendung der *in vitro* selektierten anti-HIV-1 Rev-Aptamere wurde die genaue Lokalisation und Struktur des Rev bindenden Teils (Rev-bindung elements/RBE) des RRE *in vitro*

Einleitung

bestimmt (Giver, *et al.*, 1993). Durch NMR-Strukturanalyse konnte bestätigt werden, daß eine α -helikale Konformation des Rev-Peptides sowohl durch Bindung des RBE, als auch durch Bindung eines Rev-Aptamers induziert wird (Hermann und Patel, 2000). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß die intrazellulär exprimierten Rev-Aptamere die Funktion des Wildtyp RBE's übernehmen können (Symensma *et al.*, 1996).

Der prokaryotische Elongationsfaktor SELB wird für den Einbau der Aminosäure Selenocystein in Selenoproteine benötigt. SELB bildet bei der Translation in *E. coli* einen quarternären Komplex mit GTP, der Selenocysteyl-tRNA und einer Haarnadelstruktur auf der mRNA der Formiatdehydrogenase. Dieser Komplex verhindert die Termination der Proteinbiosynthese am UGA Stopcodon und ermöglicht statt dessen den Einbau der Aminosäure Selenocystein (Klug *et al.*, 1999). Mit Hilfe der von Klug *et al.* beschriebenen SELB-Aptamere, die *in vivo* aktiv sind, konnte das Modell der Insertion von Selenocystein in prokaryotische Proteine und die Bedeutung der Haarnadelstruktur der mRNA für die Formiatdehydrogenase erweitert werden (Famulok, *et al.*, 2000).

Bei einer Vielzahl von renalen Erkrankungen existieren Hinweise auf eine potentielle pathogenetische Rolle des *platelet derived growth factors* (PDGF) (Floege und Johnson, 1995). Durch Untersuchungen mit dem nukleaseresistenten PDGF-antagonistischen Aptamer sowohl in humanen Mesangialzellen als auch in einer Interventionsstudie am mesangioproliferativen Nephritis Modell der Ratte konnte die Annahme bestätigt werden, daß die Freisetzung von PDGF-B in der mesangioproliferativen Glomerulonephritis ein zentrales, pathogenetisches Ereignis darstellt (Floege *et al.*, 1999).

Diese Beispiele zeigen das Potential der *in vitro* selektierten Aptamere für die Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen und deren Bedeutung bei der Aufklärung von komplexen, biologischen Prozessen.

1.1.4 Aptamere und monoklonale Antikörper in Vergleich

Die Detektion und Quantifizierung von Molekülen spielt eine wichtige Rolle in Wissenschaft und Medizin. Dabei steigt der Bedarf an selektiveren und sensitiveren

Einleitung

Erkennungsmodulen. Aptamere lassen sich bereits in ihrer Entwicklungsphase (*in vitro* Selektion) hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften wie Dissoziationskonstanten und Spezifitäten gezielt beeinflussen. Im Gegensatz dazu sind diese Parameter bisher in der klassischen Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybridomzelllinien nicht steuerbar.

Insbesondere ist es technisch schwierig, mAK, die toxische oder schwach immunogene Substanzen erkennen oder unter nicht physiologischen Bedingungen ihr Zielmolekül binden, zu produzieren (Jayasena, 1999). Dies ist mit *in vitro* hergestellten Aptameren möglich, was am Beispiel des Taq-Polymerase-Aptamers deutlich wird (Dang und Jayasena, 1996), (Lin und Jayasena, 1997). Das Aptamer inhibiert die Polymerase bei Temperaturen unter 40°C und ermöglicht damit die spezifische Vervielfältigung schwer amplifizierbarer DNA-Sequenzen. Ein monoklonaler Antikörper, welcher die Aktivität der Taq-Polymerase bei niedrigen Temperaturen inhibieren sollte, wurde im Gegensatz zu den untersuchten Aptameren im Verlauf der PCR durch die zyklisch auftretenden Temperaturerhöhungen denaturiert (Jayasena, 1999).

Ein weiterer Vorteil der Aptamere gegenüber den mAK ist die geringere Immunogenität im Organismus, eine lange Haltbarkeit und die Möglichkeit zur chemischen Synthese, was eine Reproduzierbarkeit und Konsistenz unterschiedlicher Chargen sicherstellt. Durch Automatisierung des Selektionsprozesses ist eine Beschleunigung der Aptamerherstellung von mehreren Wochen (manuell) bis auf einige Tage (automatisiert) bereits möglich. Mit der Weiterentwicklung der Aptamertechnologie können neue Anwendungsgebiete erschlossen werden (Cox *et al.*, 1998).

Ziel dieser Arbeit war die Selektion und Charakterisierung von Aptameren gegen die beiden Zielmoleküle Neuropeptid Y (NPY) und das Prionprotein.

Einleitung

1.2 Das Neuropeptid Y (NPY)

Das Neuropeptid Y wurde erstmals 1982 von Tatemoto aus Schweinehirn isoliert (Tatemoto *et al.*, 1982). Zusammen mit dem Pankreatischen Polypeptid (PP) und dem Peptid YY (PYY) gehört NPY zur Familie der pankreatischen Polypeptide. Gemeinsames Merkmal dieser strukturverwandten, tyrosinreichen Peptide ist eine Sequenz von 36 Aminosäuren mit einem C-terminalem Tyrosinamidrest (vgl. Abb.1) (Conlon *et al.*, 1991), (Larhammar, 1996). Während NPY als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem fungiert, haben PYY und PP hauptsächlich Hormoncharakter (Michel *et al.*, 1998). Hohe Konzentrationen an NPY sind vor allem im Gehirn, speziell im Hypothalamus, im Nucleus accumbens und in den Corpus Amygdaloideum (Mandelkern) nachgewiesen worden (Chronwall, 1985), (O'Donohue *et al.*, 1985).

Das Neuropeptid Y ist ein evolutionär hoch konserviertes Peptid, was eine bedeutende Rolle in der Regulation von fundamentalen physiologischen Funktionen vermuten lässt. So unterscheiden sich das NPY von Schwein und Mensch nur in einer einzigen Aminosäure an Position 17 (hNPY: Methionin, pNPY: Leucin). Selbst die NPY-Sequenz des entwicklungsgeschichtlich sehr weit entfernten Rochen (*Torpedo mamorata*) ist in 33 der 36 Positionen identisch mit dem humanen NPY (Larhammar, 1996).

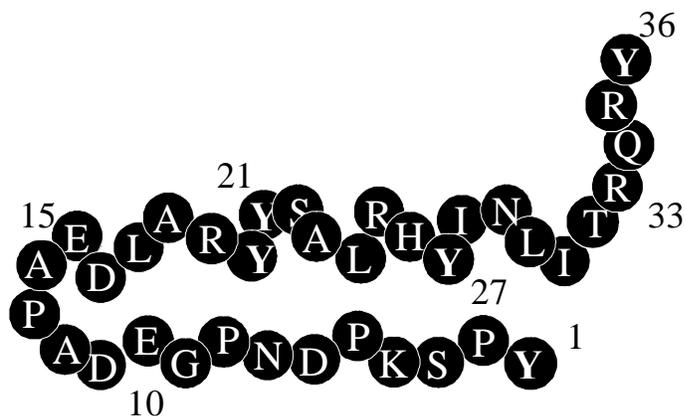


Abbildung 1 Die Primärstruktur vom Neuropeptid Y

Einleitung

1.2.1 Struktur und Funktion von NPY

Das dreidimensionale Strukturmodell von NPY basiert auf Kristallstrukturdaten für das Pankreatische Polypeptid des Truthahns (aPP) (Glover *et al.*, 1983), auf vergleichenden Sekundärstrukturuntersuchungen von NPY und aPP mittels Cirkulardichroismus (Tonan *et al.*, 1990) und auf 2-D NMR-Analysen (Saudek und Pelton, 1990), (Darbon *et al.*, 1992). Dieses Modell stimmt weitgehend mit der durch molekulares Modelling generierten Struktur von Allen und Mitarbeitern überein (Allen *et al.*, 1987).

Dabei ist eine N-terminale Polyprolinhelix (AS 1-8) antiparallel über einen β -Turn (AS 9-14) mit einer α -Helix verbunden (AS 15-32). Während die beiden Helices durch hydrophobe Wechselwirkungen eng assoziiert sind, ist der C-Terminus relativ frei beweglich. Dieses als "PP"-Faltung bezeichnete haarnadelförmige Motiv ist charakteristisch für alle Mitglieder der pankreatischen Polypeptidfamilie (Monks *et al.*, 1996).

NPY ist bei der Steuerung einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von Bedeutung: Die NPY-Freisetzung führt beispielsweise zur Steigerung der Nahrungsaufnahme (Inui, 1999), (Loftus *et al.*, 2000), zur Hemmung der Lipolyse, zur Erhöhung der Aktivität der Lipoproteinlipase und damit zur Steigerung der Fettspeicherung (Ingenhoven und Beck-Sicking, 1999). NPY moduliert innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) die Steigerung der Sekretion von luteinisierendem Hormon und Insulin sowie die Reduktion der Sekretion von Wachstumshormonen (Kalra *et al.*, 1992), (McDonald *et al.*, 1985), (Moltz und McDonald, 1985). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird NPY eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von Fettleibigkeit und Diabetes zugeschrieben. Im peripheren Nervensystem wirkt NPY direkt gefäßverengend bzw. potenziert die vasokonstriktorische Wirkung von Noradrenalin und Angiotensin II (Maturi *et al.*, 1989), (Wahlestedt und Hakanson, 1986), (Lundberg *et al.*, 1987). Desweiteren verstärkt NPY Gedächtnisleistungen (Flood *et al.*, 1989) und reguliert den zirkadianen Rhythmus von Säugern (Hall *et al.*, 1999). Vergleichende Studien mit NPY-defizienten und NPY überexprimierenden Mäusen zeigten, daß der experimentelle Alkoholkonsum von Mäusen umgekehrt proportional zu dem NPY-

Einleitung

Spiegel im Gehirn ist. Tiere mit normaler NPY-Expression hatten eine geringere Präferenz für Alkohol und reagierten empfindlicher auf dessen hypnotische Eigenschaften (Thiele *et al.*, 1998).

Die Beteiligung des NPY bei der Steuerung von verschiedenen physiologischen Prozessen erfordert mechanistisch eine komplexe Signaltransduktion zur Generierung von selektiven Steuerungssignalen in den einzelnen Effektororganen. Dabei wird angenommen, daß die unterschiedlichen Rezeptorsubtypen durch die Bindung verschiedener NPY-Konformationen und spezifischer Aminosäureseitenketten des Neuropeptidhormons selektiv aktiviert werden können (Beck-Sickinger, 1996).

1.2.2 Neuropeptid Y-Rezeptoren

Man unterscheidet derzeit sechs NPY-Rezeptorsubtypen, wobei fünf davon bereits kloniert sind (Y1, Y2, Y4, Y5 und Y6). Pharmakologische Untersuchungen legen die Existenz eines weiteren, als Y3-bezeichneten Rezeptors, nahe (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000). Die NPY-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten, heptahelikalen Membranrezeptoren (Michel, *et al.*, 1998). Die Rezeptoren sind in den verschiedensten Geweben lokalisiert, wobei besonders hohe Expressionsdichten für Blutgefäße, Nieren, Pankreas, Darm, und Gehirn charakteristisch sind (Ingenhoven und Beck-Sickinger, 1999). Die Aktivierung der NPY-Rezeptoren führt in fast allen untersuchten Geweben und Zellen zur Hemmung der Adenylatzyklase und damit zur Akkumulation von zyklischem AMP (cAMP) (Beck-Sickinger, 1996). Daneben sind weitere Signalantworten beschrieben, so die Hemmung von Ca⁺⁺-Kanälen in Neuronen (Walker *et al.*, 1988), die Modulation von K⁺-Kanälen in Kardiomyozyten (Bleakman *et al.*, 1991) sowie die Freisetzung von Ca⁺⁺ aus intrazellulären Speichern (Perney und Miller, 1989). Aus historischer Sicht wurden die Rezeptoren, die nur durch das Holopeptid-NPY aktiviert werden können, als Y1-Rezeptoren bezeichnet, während die auch durch C-terminale NPY-Fragmente, wie z. B. NPY 13-36 und NPY 18-36, aktivierbaren Rezeptoren der Y2-Klasse zugeordnet wurden.

Aufgrund der Beteiligung von NPY an zahlreichen zentralen und peripheren Effekten

Einleitung

kommt der Entwicklung von Rezeptorsubtypspezifischen Wirkstoffen besondere Bedeutung zu. Voraussetzung dafür ist eine detaillierte Charakterisierung der unterschiedlichen Rezeptorsubtyp-Ligand-Komplexe.

1.2.3 Charakterisierung der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung

Generell sind strukturelle Aussagen bezüglich der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sehr schwierig. Mit der vor kurzem gelösten, ersten Röntgenkristallstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, dem Rhodopsin, wurde ein Meilenstein auf dem Weg zur Aufklärung der Interaktion von Rezeptor und Ligand für diesen speziellen Fall erzielt (Palczewski *et al.*, 2000). Aufgrund der Homologie zwischen den unterschiedlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind bedingt auch Rückschlüsse auf die funktionellen Domänen von NPY-Rezeptoren möglich. Über die molekularen Mechanismen der Signalübertragung, die genauen Bindungsstellen und die spezifischen NPY-NPY-Rezeptorsubtypwechselwirkungen ist bisher jedoch wenig bekannt. Deren genaue Charakterisierung erfordert den Einsatz von alternativen Untersuchungsmethoden. Durch indirekte Methoden, wie Mutagenesen innerhalb der Transmembranregionen und der extrazellulären Loops der Rezeptoren, wurde eine Vielzahl der Struktur-Funktionsbeziehungen von NPY mit den verschiedenen Rezeptorsubtypen aufgeklärt (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000). Die Entwicklung von anti-Rezeptor-Antikörpern sollte weitere Einblicke in die strukturellen Verhältnisse von Rezeptor und Ligand ermöglichen (Eckard *et al.*, 1999). Obwohl die großen Immunglobuline spezifisch an einen Rezeptorsubtyp binden können, sind sie oft nicht in der Lage, den natürlichen Liganden kompetitiv zu inhibieren. Durch die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor kann eine Signalübertragung ausgelöst werden, welche normalerweise nur nach Aktivierung durch ein Hormon oder Neurotransmitter stattfindet (Strosberg, 1992). Auch durch Modifikationen der Primär- und demzufolge der Sekundär- und Tertiärstruktur des natürlichen Liganden NPY konnten weitere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Rezeptor und Ligand gesammelt werden. Der systematische Austausch der 36 Aminosäuren des NPY gegen Alanin (sog. Alaninscan) sowie verschiedene Aminosäuredeletionen und Aminosäuresubstitutionen führte zur Identifizierung von

Einleitung

für die Ligand-Rezeptor-Interaktion wichtigen Aminosäuren (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000). Mit Hilfe der Erkenntnisse aus Untersuchungen der NPY-Analoga und NPY-Fragmente an nativen Rezeptorsubtypen und Rezeptormutanten konnten, zusammen mit Kompetitionsstudien in Gegenwart von Antikörpern gegen die extrazellulären Bereiche der Rezeptoren, Modelle der Rezeptor-Ligand-Interaktion entwickelt werden (vgl. Abb 2). Für die Interaktion des Y₁-Rezeptors mit dem NPY sind sowohl N- als auch C-Terminus des Peptides erforderlich, während im Falle des Y₂-Rezeptors kurze Fragmente des C-Terminus (z.B. NPY 18-36) die Bindungsdomäne für NPY darstellen. Der Y₅-Rezeptor kann neben dem Holopeptid-NPY auch durch partiell N-terminal-deletierte Varianten (z.B. NPY 2-36) des NPY's aktiviert werden. Ein vielversprechender Ansatz zur Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle von NPY ist die Entwicklung von hochaffinen und spezifischen Nichtpeptid-Antagonisten als "pharmakologische Werkzeuge".

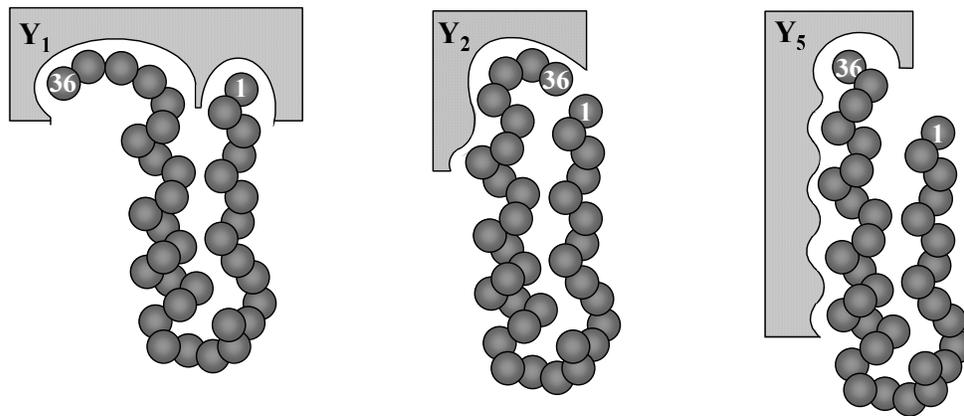


Abbildung 2 Modellvorstellungen zur Bindung von NPY an den Y₁-Rezeptor, an den Y₂-Rezeptor und an den Y₅-Rezeptor, Die Abbildung wurde von A. Beck-Sickinger freundlicherweise zur Verfügung gestellt und modifiziert.

In den folgenden Abschnitten werden die 3 Rezeptorsubtypen beschrieben, die Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren.

Einleitung

1.2.4 Der Y1-Rezeptor

Die mRNA des Y1-Rezeptors konnte im Gehirn (Hippocampus, Thalamus, Amygdala und Cortex) sowie in den peripheren Organen wie Herz, Niere, Milz und Lunge nachgewiesen werden. Die Aktivierung des Y1-Rezeptors löst eine lang anhaltende Vasokonstriktion aus und verstärkt die Wirkung anderer gefäßverengender Substanzen wie Angiotensin II und Noradrenalin (Buschauer, 2000). Auch bei der Regulation der Nahrungsaufnahme scheint dem Y1-Rezeptor neben anderen Rezeptorsubtypen eine bedeutende Rolle zuzukommen (Inui, 1999). Die vom zentralen Nervensystem vermittelten Wirkungen der Anxiolyse und Sedation werden vom Y1-Rezeptor moduliert (Heilig *et al.*, 1993). Das pharmakologische Profil des Y1-Rezeptors ist durch eine hohe Affinität zum NPY (IC_{50} : 0,2 nM) und dem PYY (IC_{50} : 0,7 nM) sowie zur NPY-Mutante NPY [P^{34}] mit einem IC_{50} -Wert von 0,5 nM charakterisiert. Bei dieser NPY-Mutante wurde der Glutaminseitenkettenrest an Position 34 durch einen Prolinrest substituiert und so ein selektiver Y1-Rezeptor Agonist geschaffen. Im Gegensatz dazu wurde eine stark reduzierte Affinität des Y1-Rezeptors zu N-terminal verkürzten Varianten von NPY und PYY beobachtet. Das um eine Aminosäure N-terminal verkürzte NPY (NPY 2-36) zeigt eine 75-fach schlechtere Y1-Rezeptor-Affinität im Vergleich zum NPY. Die Affinität noch kürzerer NPY-Varianten liegt mit K_d -Werten im mikromolarem Bereich z. B. NPY 3-36, NPY 13-36, NPY 18-36. Als erster Y1-selektiver NPY Antagonist mit einer Affinität im nanomolarem Bereich wurde das D-Argininderivat BIBP 3226 beschrieben (Cabrele und Beck-Sickingen, 2000).

1.2.5 Der Y2-Rezeptor

Der Y2-Rezeptor ist im Nervensystem vor allem zentral lokalisiert, wobei er in hoher Dichte im Hippocampus gefunden wird (Dumont *et al.*, 1992). Zahlreiche über ihn vermittelte Effekte beruhen auf einer Hemmung von Neurotransmitterfreisetzung. NPY inhibiert durch den Angriff an präsynaptischen Y2-Rezeptoren die Freisetzung von Glutamat im ZNS sowie die Freisetzung von Noradrenalin und Acetylcholin im peripheren Nervensystem. Wie bereits durch das Rezeptorbindungsmodell dargestellt (vgl. Abb.2), stellt das C-terminale Hexapeptid von NPY die

Einleitung

Bindungsdomäne an den Y2-Rezeptor dar, d.h. sowohl N-terminale Verkürzungen als auch zentrale Aminosäuredeletionen beeinflussen die Interaktion mit diesem Rezeptorsubtyp nur wenig. Selektive Agonisten (vgl. Tab. 2) sind trunkierte NPY-Peptide, NPY 13-36 (IC₅₀: 0,32 nM), NPY18-36 (IC₅₀: 0,25 nM) und NPY [Ahx⁵⁻²⁴] (IC₅₀: 2 nM). Bei der zentral verkürzten NPY-Variante NPY [Ahx⁵⁻²⁴] wurden die Aminosäuren 5-24 durch einen Aminohexansäurespacer ersetzt. Erst kürzlich ist es gelungen, den ersten selektiven Y2-Rezeptor-Antagonisten BIIIE0246 mit einer Affinität von IC₅₀: 3,3 nM zu entwickeln (Dumont *et al.*, 2000).

1.2.6 Der Y5-Rezeptor

Die Y5-mRNA wurde fast ausschließlich im Gehirn nachgewiesen, vor allem in Arealen, die für die Appetitregulation wichtig sind (Gerald *et al.*, 1996). Durch die Einführung von Alanin an Position 31 und Aminoisobuttersäure (Aib) an Position 32 wurde ein hochselektiver Y5-Rezeptoragonist geschaffen, der weder an Y1 noch an Y2 bindet. Man geht davon aus, daß die biologisch aktive Konformation des C-Terminus von NPY am Y5-Rezeptor durch eine spezielle turn-Struktur charakterisiert ist, welche durch das Dipetid Ala-Aib induziert oder stabilisiert wird (Cabrele *et al.*, 2000). Vor der Entdeckung des Y5-Rezeptors vermutete man, daß Y1 und ein Y-1 ähnlicher Rezeptor für die Appetit steigernde Wirkung von NPY verantwortlich ist. Später fand man, daß das N-terminal verkürzte NPY-Derivat NPY 2-36, welches eine niedrige Affinität zum Y1-Rezeptor besitzt, aber noch stärker die Nahrungsaufnahme stimuliert als das NPY, eine hohe Affinität zu einem neuen NPY-Rezeptor, dem Y5-Subtyp, aufweist (Buschauer, 2000). Durch die Gabe von selektiven Y5-Antagonisten (CGP 71683A) ließ sich die Nahrungsaufnahme hemmen. Die Beobachtungen an Y5 und Y1 *Knock-out*-Mäuse haben die Bedeutung von NPY in der Regulation der Nahrungsaufnahme in Frage gestellt. Weder Y1- noch Y5-Rezeptor-defiziente Mäuse verlieren an Körpergewicht (Inui, 1999). Es wird eine Beteiligung weiterer Faktoren und Rezeptoren diskutiert.

NPY ist in vielen verschiedenen physiologischen Regulationsprozessen beteiligt inwieweit NPY hier essentiell oder nur modulierend in den Steuerungsprozessen involviert ist, bedarf weiterer Klärung.

Einleitung

Rezeptor	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6
endogene Liganden	NPY (0,2 nM), hPP (>100nM)	NPY (0,04 nM) hPP (>1 µM)	NPY	PP (0,04 nM), NPY (5,5 nM)	NPY (0,6 nM), hPP (27 nM)	NPY
selektive Agonisten	NPY[P ³⁴] (0,5 nM),	NPY 18-36 (0,25 nM), NPY [AHX ⁵⁻²⁴] (2 nM),			NPY [Ala ³¹ Aib ³²] (6 nM) NPY 3-36(1 nM)	
biologische Wirkungen	Peripherie: Vasokonstriktion	Präsynaptische Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung	Inhibition der Katecholaminfreisetzung	Gastrointestinale und zentrale Effekte	ZNS: Nahrungsaufnahme	Keine Aktivität bekannt; zentrale Effekte nur bei Mäusen
Expression	Peripherie Hypothalamus	Gehirn, Hippocampus	Hirnstamm	Darm	Hypothalamus	Nicht in Primaten lokalisiert
selektive Antagonisten	BIBP3226 (7 nM)	BIIE0246 (3,3 nM)			CGP 71683A (1,4 nM)	

Tabelle 2 Charakterisierung der NPY-Rezeptorsubtypen. Die Angaben in den runden Klammern beziehen sich auf den IC₅₀-Wert. Grundlage für die Aufstellung dieser Daten war die Übersichtsartikel von Cabrele 2000 (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000).

Einleitung

1.3 Das Prionprotein

1.3.1 Prionerkrankungen - ein historischer Abriss

Zu den übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (TSE) oder auch Prionerkrankungen gehören unter anderem die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD), die Kuru-Krankheit des Menschen, die bovine spongiforme Enzephalopathie des Rindes (BSE) und Scrapie des Schafes. Schon in den sechziger Jahren stellten Alper und Mitarbeiter fest, daß die Scrapie-Proben aus Schafgehirnen gegen Nukleasen und UV-Strahlung resistent sind (Alper *et al.*, 1966). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Protein-denaturierenden Agentien, wie z.B. 8 M Harnstoff oder Phenol zum Verlust der Infektiosität (Alper *et al.*, 1967). Griffith postulierte bereits in Jahr 1967, daß der Erreger dieser neurodegenerativen Erkrankungen ein infektiöses Eiweißpartikel sein könnte, welches sich ohne die Beteiligung einer Nukleinsäure vermehrt (Griffith, 1967). Fast 15 Jahre später gelang es Prusiner und seinen Mitarbeitern, ein Protein aus Gehirnen infizierter Hamster zu isolieren, welches den von Griffith beschriebenen Eigenschaften entsprach. Prusiner führte dafür den Begriff Prionprotein (PrP) ein, die Kurzform für ein proteinartiges infektiöses Partikel (engl. proteinaceous infectious particle) (Prusiner, 1982). Die Charakterisierung des Scrapie Erregers ergab, daß zu dem pathogenen Protein ein zelluläres Homolog existiert, wobei die infektiöse PrP-Isoform (PrP^{Sc} , Sc = Scrapie) durch einen postrationalen, bisher noch wenig verstandenen Prozess aus der zellulären Isoform (PrP^{C}) entsteht (Oesch *et al.*, 1985), (Horwich und Weissman, 1997).

1.3.2 Prionerkrankungen des Menschen

Spongiforme Enzephalopathien (Prionerkrankungen) des Menschen haben sich als durch eine Infektion erworbene, aber auch vererbare und sporadisch auftretende Erkrankungen manifestiert (vgl. Tab. 3)

Einleitung

Erkrankung	Ätiologie
Kuru	Infektion
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	
-iatrogen (iCJD)	Infektion
-sporadisch (sCJD)	unbekannt
-infektiös (nvCJD)	Infektion
-familiär (fCJD)	PrP-Mutation
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	PrP-Mutation
Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	PrP-Mutation

Tabelle 3 Prionerkrankungen des Menschen

Die CJD-Krankheit tritt in den meisten Fällen sporadisch (sCJD) auf (80-90%), ohne daß eine Infektionsquelle oder eine genetische Prädisposition feststellbar sind. Die sCJD betrifft in der Regel Patienten im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt. Erste Auffälligkeiten sind progressive Demenz und verschiedene weitere neurologische Symptome wie Ataxie und Myoklonien (Kretzschmar, 2000). Wenige Fälle von CJD (iCJD) werden auf iatrogene Infektionen bei medizinischen Behandlungen zurückgeführt, beispielsweise bei Hornhautverpflanzungen am Auge, durch Verwendung kontaminierter chirurgischer Instrumente oder Injektion von Wachstumshormonen aus Hypophysen von CJD-erkrankten Patienten (Masson *et al.*, 1994). Neben den iatrogenen und sporadischen Fällen treten in etwa 10% hereditäre Formen auf wie GSS, FFI und fCJD. Hereditäre Prionkrankheiten lassen sich relativ einfach durch Untersuchung der Sequenz des Prionproteingens erkennen. Bei einer in Deutschland durchgeführten CJD-Untersuchung wurden von 1993 bis 1998 insgesamt 587 Verdachtsfälle molekulargenetisch analysiert. Dabei war bei 40 Patienten eine pathogene Mutation am Prionprotein nachweisbar (Prusiner *et al.*, 1998), (Kretzschmar, 2000). Das pathoanatomische Korrelat der CJD-Krankheit ist charakterisiert durch eine schwammartige Zersetzung des Gehirns (Spongiosis) bzw. Vakuolisierung in Folge von Ablagerungen des Prionproteins (PrP^{Sc}) und dem Absterben neuronaler Zellen. Sie geht mit Störungen verschiedener Körperfunktionen einher wie Gedächtnisverlust, Sehschwierigkeiten und motorischen

Einleitung

Störungen. Kuru oder "der lachende Tod" wurde erstmals bei einem Stamm im Hochland von Papua-Neuguinea von V. Zigras und C. Gajdusek beobachtet. Kuru soll durch rituellen Kanibalismus übertragen worden sein und ist charakterisiert durch den Verlust der Bewegungskoordination (Ataxie), später auch der geistigen Fähigkeiten (Gajdusek, 1967). Nach dem Auftreten der ersten Symptome führen Prionerkrankungen typischerweise über progressive Demenz zum Tod (Prusiner, 1996).

1.3.3 BSE - Übertragbarkeit auf den Menschen ?

Der epidemieartige Ausbruch der Rinderseuche BSE im Jahr 1986 in Großbritannien hatte mit 3500 Neuerkrankungen pro Monat in den Jahren 1992 und 1993 seinen Höhepunkt erreicht (Anderson *et al.*, 1996). Ursache für den Anstieg war, so vermutet man, die Verfütterung von Tiermehl, welches aus Scrapie enthaltene Schafskadavern und BSE enthaltene Rindskadavern gewonnen wurde (Wilesmith *et al.*, 1991). Eine Übertragung auf den Menschen wurde zu diesem Zeitpunkt von der britischen Regierung ausgeschlossen und ca. 750000 infizierte Rinder gelangten in die menschliche Nahrungskette. Der Spiegel berichtet dazu : "Die Geschichte des Rinderwahns ist ein Lehrstück der Epidemiologie. Sie erzählt den Kampf eines neuartigen Erregers mit Behörden, die ihren Gegner unterschätzt haben" [Evers , 2000 #1830].

Im März 1996 berichtete eine englische Forschergruppe von einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) im Menschen (Will *et al.*, 1996). Diese hat mit großer Wahrscheinlichkeit ihren Ursprung in der bovinen spongiformen Enzephalopathie. Dabei unterscheidet sich die neue CJD-Variante pathologisch von den bisher beobachteten CJD-Fällen durch das Auftreten von vermehrten PrP^{Sc}-Ablagerungen in Form von floriden (blütenförmigen) Plaques im Gehirn, welche denen von Kuru Patienten und BSE-infizierten Halbaffen sehr ähnlich sind (Lasmezas *et al.*, 1996). Weiterhin sind die an nvCJD verstorbenen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 29 Jahren auffällig jung und die Krankheitsdauer, d.h. das Auftreten der ersten Symptome bis zum Tod, ist mit mehr als sechs Monaten länger als bei den bisher beschriebenen spongiformen Enzephalopathien des

Einleitung

Menschen (Kretzschmar, 2000). Erste Hinweise auf einen Zusammenhang von nvCJD und BSE wurden 1997 von den Arbeitsgruppen um M. Bruce und J. Collinge erbracht. Bruce konnte zeigen, daß sowohl die Pathologie als auch die Inkubationsdauer der mit BSE- und nvCJD-Hirnmateriale infizierten Mäuse im Gegensatz zu den Scrapie-infizierten Mäusen fast identisch sind. Collinge untersuchte das Glykosylierungsmuster von Proben aus nvCJD und BSE Gehirnen im Vergleich zu den sCJD und den iCJD Proben nach elektrophoretischer Auftrennung (Bruce *et al.*, 1997), (Hill *et al.*, 1997). Er konnte feststellen, daß die nvCJD und BSE-Proben im Gegensatz zu dem Hirnmateriale aus den Patienten, welche an sCJD oder iCJD verstorben sind, ein gemeinsames Glykosylierungsmuster aufweisen. Allerdings sind die von Collinge beschriebenen Unterscheidungskriterien sehr umstritten (Parchi *et al.*, 1997). Weiterhin wurde die potentielle Übertragung von BSE auf den Menschen an transgenen Tiermodellen untersucht.

1.3.4 Transgene Tiermodelle und Speziesbarriere

Die experimentelle Übertragung von spongiformer Enzephalopathie innerhalb einer Art gelingt effizienter als eine Übertragung zwischen unterschiedlichen Spezies. Man spricht bei diesem Phänomen von der "Speziesbarriere". Beispielsweise entwickeln Mäuse nach Inokulation mit infizierten Hamsterhirnmateriale keine typischen Symptome innerhalb ihrer durchschnittlichen Lebensdauer von 600 Tagen. Man vermutet als Ursache für diese "Speziesbarriere" die unterschiedlichen Primärstrukturen der Prionproteine von Donor und Empfänger (Prusiner *et al.*, 1990). Durch Einführung eines PrP-Transgenes in eine Wildtyp-Maus wird die sogenannte Speziesbarriere im Hinblick auf eine Erkrankung nach Erstinfektion durchbrochen. Eine wesentliche Verstärkung dieses Effektes tritt auf, wenn das endogene PrP-Gen der Maus ausgeschaltet wird (Telling *et al.*, 1995). Mit der Generierung von transgenen Mäusen, bei welchen das endogene Maus PrP durch das humane PrP oder bovine PrP ersetzt wurde, sollte ein Modell geschaffen werden, auf dessen Basis der Zusammenhang von nvCJD und BSE im Vergleich untersucht werden kann. Dabei zeigte sich für die transgene "bovine PrP" Maus nach Infektion mit BSE

Einleitung

oder nvCJD ein einheitliches Bild hinsichtlich der Pathologie der klinischen Symptomatik insbesondere für die Inkubationszeiten, von dem sich eine mit sCJD infizierte transgene Maus deutlich unterschied (Scott *et al.*, 1999). Umgekehrt ist die experimentelle Übertragung von nvCJD-Prionen und BSE-Prionen auf transgene Mäuse, welche humanes PrP exprimieren, nur sehr ineffizient bzw. mit einer langen Inkubationsdauer verbunden, während eine Infektion mit sCJD oder iCJD-Material durch eine typische kürzere Inkubationsdauer von ca. 260 Tagen charakterisiert ist (Hill, *et al.*, 1997).

Hill *et al.* konnten kürzlich zeigen, daß Mäuse, welche mit Hamsterprionen infiziert wurden, zunächst zwar keine typischen klinischen Symptome entwickeln, jedoch nach 600 Tagen und länger Träger des Erregers sind. Inokuliert man die Gehirnhomogenate dieser Mäuse in einer zweiten experimentellen Passage in Hamster und Mäuse, so zeigen beide Tierarten innerhalb der typischen Inkubationszeit Krankheitssymptome. Damit stellte er in seinen Studien die "Speziesbarriere" und deren Definition in Frage (Hill *et al.*, 2000).

Mit dem Auftreten von spektakulären CJD Erkrankungsfällen bei Kindern im Alter von 12 bis 14 Jahren, der Übertragung von Scrapie auf Schafe durch Injektion von infektiösem Blut und der potentiellen intrauterinen Übertragbarkeit von CJD von der Mutter auf das Kind sind die Prionerkrankungen auch ins Zentrum der öffentlichen Diskussion bei Medien und politischen Entscheidungsgremien gerückt (Bonn, 2000), (Andrews *et al.*, 2000). Eine routinemäßige Anwendung eines sensitiven BSE-Tests bei allen geschlachteten Tieren, die älter als 30 Monate sind, ist bereits gesetzlich vorgeschrieben.

1.3.5 Das Prionprotein (PrP)

Das zelluläre Prionprotein (PrP^C) wird in allen bisher untersuchten Säugertierarten und einigen Vogelarten vor allem im Gehirn exprimiert (Wopfner *et al.*, 1999). Innerhalb der Primaten weist das Protein eine Aminosäuresequenzhomologie von 92,9 - 99,6% auf, womit es zur Klasse der hochkonservierten Proteine zählt (Schatzl *et al.*, 1995). Die PrP mRNA wird vollständig von einem Exon des singulären Prnp-Gens kodiert, welches beim Menschen auf dem Chromosom 20 lokalisiert ist. Die

Einleitung

Primärstruktur des Prionproteins, welches aus gesunden (PrP^{C}) und Scrapie infizierten Tieren (PrP^{Sc}) isoliert wurde, ist identisch (Basler *et al.*, 1986) (vgl. Abb. 3). Das Prionprotein existiert in zwei Isoformen, der zellulären Isoform PrP^{C} und der pathogenen Isoform PrP^{Sc} , welche sich trotz identischer Primärstruktur biochemisch und biophysikalisch stark unterscheiden (vgl. Tab. 4).

	Zellulär (PrP^{C})	Pathogen (PrP^{Sc})
PK-Resistenz	sensitiv	partielle Resistenz
Molekulargewicht (-PK)*	33-35 kDa	33-35 kDa
Molekulargewicht (+PK)*	degradiert	27-30 kDa
Löslichkeit in Detergentien	löslich	unlöslich
Halbwertszeit	Kurz (2-4 h)	Lang (> 24 h)
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Lokalisierung	Zelloberfläche, GPI-verankert	sekundäre Lysosomen, (McKinley <i>et al.</i> , 1991), Ablagerungen

Tabelle 4 Unterschiede zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} : biochemische, physikalische und pathologische Aspekte, * zweifach glykosilierte PrP -Formen.

Man geht davon aus, daß PrP^{C} durch einen posttranslationalen Prozess in PrP^{Sc} konvertiert werden kann, wobei der Mechanismus der Konversion sowie die Beteiligung zusätzlicher Faktoren noch immer unbekannt ist. Durch CD-Messungen und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) konnte eine deutliche Verschiebung des α helikalen Anteils von PrP^{C} (42% α -helikal, 3% β -Faltblatt) in eine von β -Faltblättern dominierende Sekundärstruktur von PrP^{Sc} (30% α -helikal, 45% β -Faltblatt) festgestellt werden (Pan *et al.*, 1993). Mit der Veränderung der Sekundärstruktur und der Tertiärstruktur verändert sich sowohl das Löslichkeitsverhalten von PrP^{Sc} in nichtionischen Detergentien als auch die

Einleitung

Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K. Außerdem weist PrP^{Sc} eine hohe Tendenz zur Aggregatbildung auf. Pathologisch führt dieser Prozess zu fibrillären Ablagerungen im Gehirn und makroskopisch zu einer schwammartigen Durchlöcherung des Gewebes (Prusiner, 1998). Infektiösität konnte bisher nur für die PrP^{Sc}-Isoform nachgewiesen werden. Verschiedene Versuche, *in vitro* Infektiösität für rekombinantes PrP zu erzeugen und diese im Tierversuch nachzuweisen, waren bisher erfolglos (Adriano Aguzzi persönliche Mitteilung).

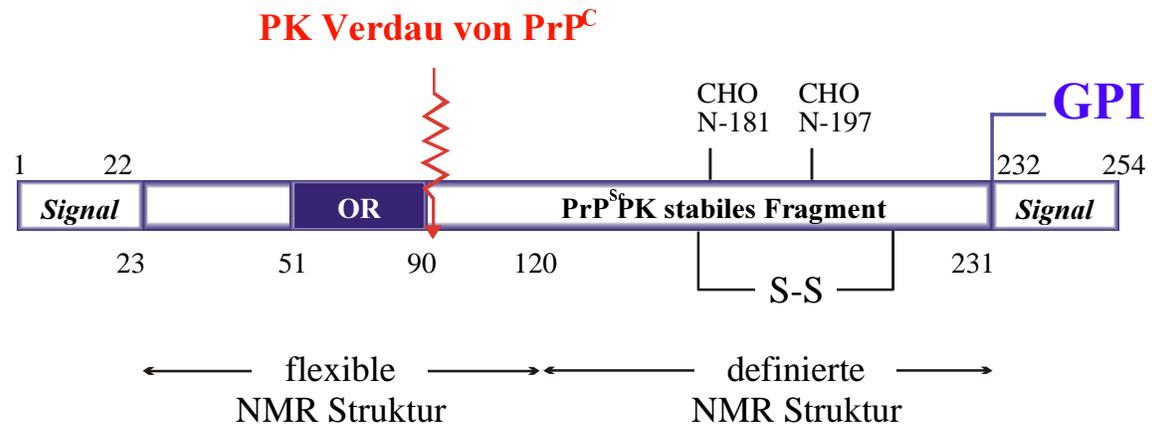
1.3.6 Primär- und Tertiärstruktur des Prionproteins

In Abb. 3 ist die 254 Aminosäure lange Primärstruktur des Hamster-PrP dargestellt. Das Signalpeptid (Aminosäure 1-22) sowie die Signalsequenz (Aminosäure 232-254) am C-Terminus werden durch posttranslationale Modifikation abgespalten (Basler, *et al.*, 1986), (Oesch, *et al.*, 1985). Durch einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker ist das Protein über den Serinrest an Position 231 mit der Zellmembran verankert (Stahl *et al.*, 1987). Während das zelluläre PrP durch Proteinase K Behandlung vollständig degradiert wird, führt ein Proteinase K-Verdau der infektiösen Isoform lediglich zur Abspaltung des N-Terminus (AS 23-90). Diese verkürzte PrP^{Sc}-Form, oder PrP^{res}-Form (Caughey und Raymond, 1991), wird aufgrund ihres Laufverhaltens im SDS-Gel auch als 27-30kDa -PrP bezeichnet (Bolton *et al.*, 1982). Sowohl PrP^{Sc} als auch PrP^C können als di-, mono- und nicht glykosilierte Form nachgewiesen werden. Dabei stellen die Asparaginreste N-181 und N-197 die Glykosylierungspositionen dar (Bolton *et al.*, 1985). In der Region AS 51-90 befinden sich fünf hintereinanderliegende glycin- und prolinreiche Octapeptidsequenzen (sog. Octarepeats). Zusätzliche Octarepeatinsertionen im Prionprotein werden mit verschiedenen klinischen Formen von vererbaren spongiformen Enzephalopathien des Menschen in Zusammenhang gebracht. Während 4 bis 7 Octarepeatinsertionen zu Prionproteinablagerungen im Gehirn führen, werden bei 8 bis 9 Octarepeatinsertionen Plaquebildungen beobachtet (Vital *et al.*, 1998).

Im oxidierenden Milieu wird die Struktur des Prionproteins durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein 179 und Cystein 214 stabilisiert. Diese

Einleitung

Erkenntnis nutzte die Gruppe von Glockshuber und Wüthrich experimentell aus, um erstmals große Mengen an murinem PrP periplasmatisch in *E. coli* zu exprimieren. Damit gelang die Aufklärung der ersten dreidimensionalen Struktur einer N-terminal verkürzten Domäne des Maus-PrP (AS 121-231) durch NMR-Spektroskopie (Riek,



1996).

Abbildung 3 Primärstruktur des Prionproteins: 1-22 Signalpeptid, 232-254 Signalsequenz, OR= Oktarepeatregion, PK= Proteinase K. Die Asparaginreste (CHO) N181 und N197 repräsentieren Glykosylierungsstellen. Die Disulfidbrücke (S-S) befindet sich zwischen den Cysteinresten C179 und C214. Die PK-sensitive Region erstreckt sich bis AS 90, PK-Behandlung führt zur PrP^C-Degradation und N-terminalen Verkürzung von PrP^{Sc} zum 27-30 kDa Form.

Bis heute wurde von folgenden Spezies die NMR-Struktur des Prionproteins aufgeklärt: das murine PrP (Riek *et al.*, 1997), das PrP des Syrischen Goldhamsters (Donne *et al.*, 1997), das humane PrP (Zahn *et al.*, 2000) und im Mai diesen Jahres das bovine PrP (Garcia, 2000).

Die NMR-Struktur des humanen Prionproteins der vollen Länge (AS23-230) besteht aus einer strukturierten, globulären Domäne (AS125-228) und der flexiblen N-terminalen Domäne (vgl. Abb. 4). Aufgrund der Unlöslichkeit von PrP^{Sc} liegen dafür weder NMR-Strukturuntersuchungen noch Röntgenkristallstrukturdaten vor.

Ein Kriterium für die Selektionsstrategie von Aptameren gegen ein Prionpeptid war die Auswahl eines funktionell relevanten Teilbereiches des Prionproteins (vgl. Kapitel

Einleitung

5.3), welches NMR-Strukturdaten zufolge innerhalb des Gesamtproteinkontextes als Epitop zugänglich war.

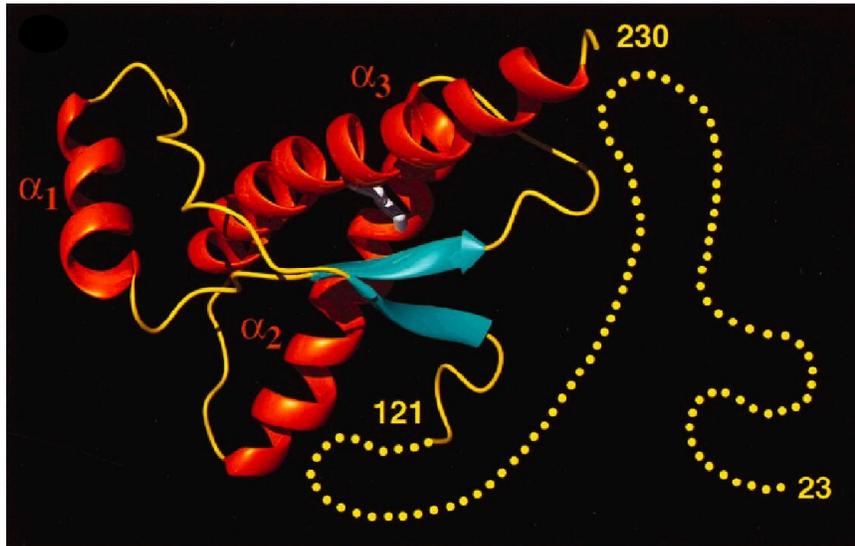


Abbildung 4 NMR Struktur des humanen PrP^C AS 23-230 Die beiden carboxyterminalen α Helices α_2 AS 173-194 und α_3 AS 200-228 sind V-förmig gegeneinander verdreht und durch eine Disulfidbrücke zwischen der AS C179 und C214 verbunden. Die aminoterminalen α_1 Helix AS 144-154 ist von zwei antiparallelen β -Faltblättern flankiert (β_1 AS 128-131, β_2 AS 161-164) (Quelle (Zahn, et al., 2000)).

1.3.7 Die physiologische Funktion des Prionproteins

Die Konstruktion von knock-out Mauslinien ist eine etablierte Methode, um die biologische Funktion eines Proteins aufzuklären (Brandon *et al.*, 1995). Die Herstellung von PrP-knock-out (PrP^{0/0})-Mäusen führte in drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Phänotypen. Die im Weissmann Labor erzeugte PrP^{0/0}-Maus (ZrCh/C57Bl-129/Sv), bei welcher 80% des PrP-Gens durch Insertion einer Neomycin-Kassette ersetzt wurde, entwickelt sich normal und zeigt keine Verhaltensauffälligkeiten oder neurologische Fehlfunktionen (Bueler *et al.*, 1992). Auch die in Edinburgh erzeugte PrP^{0/0}-Maus (RML/129-Ola) zeigt keine phänotypischen Veränderungen. Tobler und Mitarbeiter beobachteten später bei

Einleitung

diesen beiden PrP-defizienten Mauslinien (ZrCh und RML) Veränderungen im zirkadianen Rhythmus im Vergleich zur Wildtyp-Maus (Tobler *et al.*, 1996). Eine dritte von einer japanischen Gruppe generierte PrP-knock-out-Mauslinie (*Ngsk Pmp PrP^{0/0}/ C57Bl-129/Sv*) ist charakterisiert durch den Verlust von Purkinje-Neuronen und den damit verbundenen Ataxiesymptomen (Sakaguchi *et al.*, 1996). Es wird diskutiert, daß letzterer phänotypische Unterschied zur "Weissmann"-Maus auf eine zusätzliche Deletion eines Purkinje-Zell-spezifischen Enhancers in der 3' nichtkodierenden Region (3'UTR) des PrP-Gens zurückzuführen ist. Allen Knock-out-Mäusen gemeinsam ist die Resistenz gegenüber Infektion durch Scrapie-Material (Bueler *et al.*, 1993), (Prusiner *et al.*, 1993).

Die Scrapie-Suszeptibilität der PrP defizienten Mäuse kann durch Expression des Wildtyp-PrP's oder PrP-Varianten, die N-terminal um 49 Aminosäuren verkürzt sind, wieder hergestellt werden (Fischer *et al.*, 1996).

Weiter wurde mit transgenen Mäusen, die anstelle des endogenen PrP^C mit PrP-Konstrukten unterschiedlicher N-terminaler Verkürzung transfiziert wurden, versucht die physiologische Bedeutung des Prionproteins und seiner einzelnen Domänen näher zu untersuchen (Shmerling *et al.*, 1998). Für die Konstrukte mit Deletionen im Bereich AS 32-106 konnte keine Veränderung des Phänotyps dieser Mäuse dokumentiert werden. Konstrukte mit Deletionen weiterer N-terminaler Aminosäurereste (AS 32-121 und AS 32-134) hingegen erzeugen deutliche Effekte in den Tieren wie schwere Verhaltensstörungen, Untergewicht sowie neuronale Veränderungen im Gehirn.

Da diese Phänotypen nicht in PrP^{0/0}-Mäusen auftreten, postulierten die Autoren einen zellulären Faktor π , der kompetitiv an den noch nicht eindeutig identifizierten Prionprotein Liganden oder Rezeptor bindet und eine physiologische Reaktion analog dem PrP hervorrufen kann. Entsprechend dieser Modellvorstellung ist das um 89 bzw. um 102 Aminosäuren N-terminal verkürzte PrP-Konstrukt zwar in der Lage, den Faktor π zu verdrängen, jedoch selbst nicht funktionell (Shmerling, *et al.*, 1998). Westaway ist es gelungen, ein Protein zu identifizieren, welches sich 16 kb vom PrP-Genlocus entfernt befindet und auf Primärstrukturebene sowie in den biochemischen Eigenschaften dem PrP sehr ähnlich ist. Dieses neue Protein, welches den zellulären

Einleitung

Faktor π repräsentieren könnte, wurde als PrP-LP/Dpl (PrP-like Protein/ Doppel) oder als Doppel bezeichnet (Moore *et al.*, 1999).

Für PrP^C konnte in weiteren Funktionsstudien eine Caveolin abhängige Bindung von PrP^C an die Tyrosinkinase Fyn beobachtet werden, die eine mögliche Rolle von PrP in der intrazellulären Signaltransduktion nahelegt (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Eine direkte physiologische Interaktion von PrP und Caveolin konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden (Keshet *et al.*, 2000).

Die Frage nach der physiologischen Funktion des Prionproteins wird noch heute kontrovers diskutiert.

1.3.8 Die Replikation des Prionproteins

Bis heute existieren zwei sich grundlegend mechanistisch unterscheidende Modelle zur Prionreplikation: das Protein-only-Modell und das Virino-Modell. Mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Prusiner (1997), dem Begründer der Protein-only-Hypothese, hat sich dieses Modell in der wissenschaftlichen Gemeinschaft durchgesetzt.

Einleitung

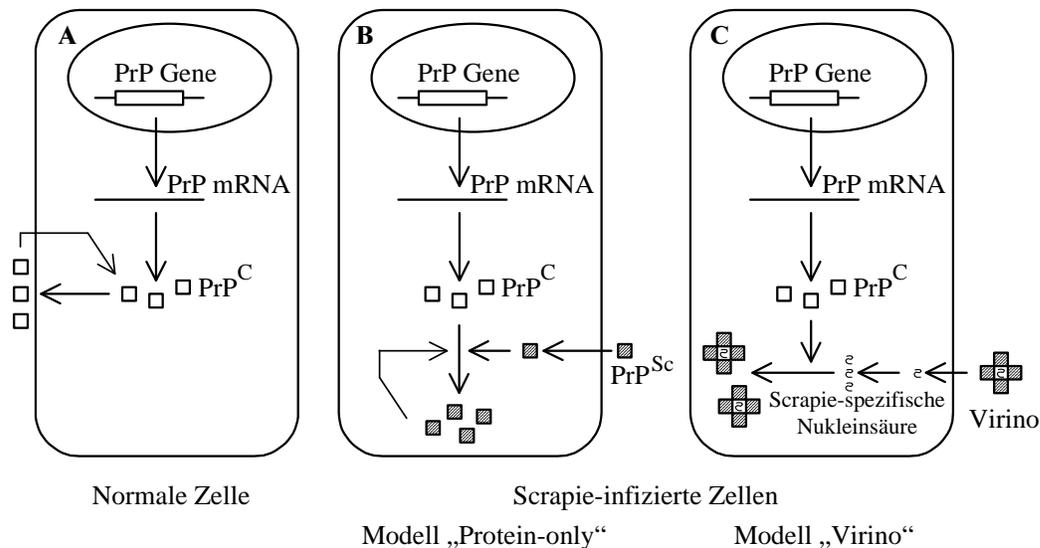


Abbildung 5 Modelle zur Prionpropagation modifiziert nach Weissmann (Weissmann, 1995):

A) nicht infizierte, normale Zelle: PrP^C wird synthetisiert, zur Zelloberfläche transportiert und reinternalisiert;

B) Das **Protein-only-Modell**: Das zelluläre PrP wird exogen durch PrP^{Sc} bzw. endogen durch Mutationen oder sporadisch in PrP^{Sc} konvertiert. Die Konversion findet entweder an der Zelloberfläche oder nach Internalisierung von PrP^{Sc} statt.

C) Das **Virino-Modell**: Das infektiöse Agens, eine Nukleinsäure umhüllt von PrP^{Sc}, gelangt vermutlich über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle und repliziert sich dort mit Hilfe der zellulären Replikationsmaschinerie. Die Tochtermoleküle bilden mit PrP^C neue Virionen.

1.3.9 Das Virino-Modell

Während Viren ihre Schutzhülle genetisch selbst bestimmen, soll im Fall der Virino-Hypothese die TSE-spezifische Nukleinsäure zum Schutz vor chemischen oder mechanischen Einflüssen in einen genetisch von der Wirtszelle determinierten Mantel schwer löslichen Amyloides versteckt sein. Dieser Amyloidmantel wird aus PrP^{Sc}-Molekülen gebildet. Das Konzept der Virus-induzierten Amyloidose basiert auf verschiedenen Befunden: Es gibt mindestens acht verschiedene TSE-Stämme, die sich in ihren Eigenschaften, wie z. B. der Art und Verteilung der Schädigung und den

Einleitung

Inkubationszeiten, unterscheiden (Lasmezas *et al.*, 1996). Diese Stämme werden durch Infektion von Versuchstier zu Versuchstier unter Beibehaltung ihrer typischen Charakteristika weitergegeben (passagiert). Dies wurde als Indiz für eine vererbare Information, somit für die Beteiligung einer genetischen Komponente am Vermehrungsprozess gewertet.

Im Gegensatz dazu begründen die Protein-only-Protagonisten die Stammspezifität mit unterschiedlichen PrP^{Sc}-Konformationen und den damit verbundenen unterschiedlichen Charakteristika (Safar *et al.*, 1998).

Die Anhänger der Virinohypothese sehen die Ausbreitung des Erregers nach Infektion über den Magen-Darmtrakt in Analogie zu Viruserkrankungen.

Auf der Suche nach einem infektiösen Partikel ist es Diringen gelungen, im Elektronenmikroskop kleine, symmetrische, den Vorstellungen dieser Theorie entsprechende Strukturen von 10 nm Durchmesser in Scrapie-infizierten Hamstergehirnen zu dokumentieren (Ozel und Diringen, 1994). Ähnliche Partikel identifizierte er später in Gehirnen verstorbener CJD-Patienten (Ozel *et al.*, 1994). Eine Infektiosität dieser Strukturen konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Manuelides hat weitere Hinweise für einen Virus-ähnlichen und infektiösen Partikel, von ca. 27 nm Größe vorgelegt (Manuelidis *et al.*, 1995). Aus der selben Arbeitsgruppe stammt eine Publikation, die nukleaseresistente RNA-Moleküle von 6000 Basen, isoliert aus CJD-Hirnhomogenaten, beschreibt (Akowitz *et al.*, 1994).

Die Gruppe von Riesner jedoch schließt durch verschiedene Studien aus, daß die im infektiösen Partikel enthaltene Nukleinsäure größer als 80 Nukleotide ist (Kellings *et al.*, 1993). Damit wäre das hypothetische Genom des potentiellen infektiösen Partikels um ein vielfaches kleiner als das bekannter Viren oder Viroide. Riesner stellt entsprechend seiner Ergebnisse die Existenz eines Scrapie spezifischen Virus in Frage (Kellings *et al.*, 1994).

1.3.10 Die Heterodimer Hypothese oder das Protein-Only-Modell

Die Resistenz des infektiösen Agens gegenüber nukleinsäurezerstörenden Behandlungen, die Sensitivität gegenüber proteindenaturierenden Substanzen wie 8 M Harnstoff und Phenol (Alper, *et al.*, 1966), (Alper, *et al.*, 1967) sowie die

Einleitung

Tatsache, daß keine TSE-spezifische Nukleinsäure, kein Virus oder Virino identifiziert werden konnte, veranlaßten Prusiner ein Modell zu entwickeln, welches die Replikation eines Proteins ohne Beteiligung einer Nukleinsäure beschreibt (Prusiner, 1982). Nach dieser Protein-only- oder auch Heterodimer-Hypothese kann die zelluläre Isoform des PrP nur sehr langsam und unter Überwindung einer hohen Aktivierungsenergie in die pathogene Isoform konvertiert werden. Dieser Prozeß der Konformationsumwandlung wird vermutlich durch die Beteiligung von zusätzlichen, bisher noch nicht identifizierten Faktoren, durch bestimmte TSE-Mutationen von PrP oder durch exogene Applikation von PrP^{Sc}-Molekülen begünstigt (Prusiner, *et al.*, 1998). Entsprechend dieses Modells wird nach Ausbildung eines Heterodimers, bestehend aus PrP^C und PrP^{Sc}, das zelluläre PrP unter Einwirkung von PrP^{Sc} in ein PrP^{Sc}-Molekül konvertiert, was eine schnelle Ausbildung eines PrP^{Sc}-Homodimers zur Folge hat (vgl. Abb. 6) (Prusiner, 1991). Dieses kann wiederum in einem autokatalytischen Prozeß die Entstehung weiterer Heterodimere exponentiell beschleunigen. Kinetischen Berechnungen zufolge ist dabei die Dissoziation des PrP^{Sc}-Homodimers nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Eigen, 1996). Trotz intensiver Untersuchungen verschiedener Laboratorien ist es bisher noch nicht zweifelsfrei gelungen, PrP-Heterodimere nachzuweisen (Priola *et al.*, 1995), (Meyer *et al.*, 2000). Entsprechend dieses Modells ist eine schnelle Umwandlung der PrP-Dimere bzw. deren Instabilität zwingend notwendig.

Die Resistenz der PrP^{0/0}-Mäuse gegenüber einer Infektion mit Scrapie Material läßt zwei mögliche Interpretationen zu (Bueler, *et al.*, 1993): Zum einen sehen sich die Befürworter der Protein-only Hypothese in der exklusiven Bedeutung des Proteins als infektiöses Agens bestätigt. Die Anhänger der Virinohypothese dagegen argumentieren, daß das Prionprotein des Wirtes als viraler Rezeptor oder für die Verpackung der TSE-spezifischen Nukleinsäure benötigt wird (Akowitz, *et al.*, 1994). Eine schlüssige Beweisführung für die Protein-only Hypothese bei Säugern z.B. durch Generierung von rekombinanten infektiösen Prionproteinmaterial konnte bisher nicht erbracht werden (Mehlhorn *et al.*, 1996).

Einleitung

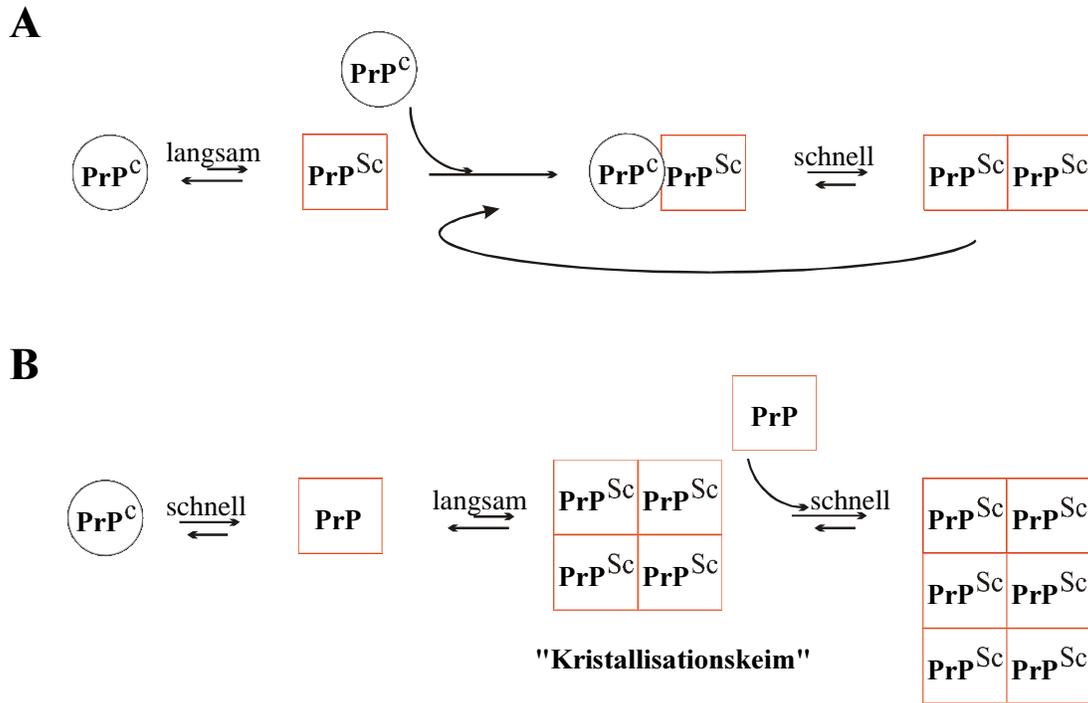


Abbildung 6 A) Das Heterodimer-Modell B) Das kernabhängige Polymerisations-Modell

1.3.11 Das kernabhängige Polymerisations-Modell

Das Modell der kernabhängigen Polymerisation basiert auf der Annahme eines kristallartigen Wachstums eines PrP^{Sc} -Oligomers ausgehend von einem Kristallisationskeim (vgl. Abb. 6). Diese Hypothese wurde bereits 1990 von Gajdusek beschrieben und von Caughey und Lansbury weiterentwickelt (Caughey *et al.*, 1997). Dabei unterscheidet sich das Modell von der Heterodimerhypothese dadurch, daß die infektiöse Einheit von einem PrP^{Sc} -Oligomer gebildet wird, welches den Keim für die anschließende Polymerisation darstellt. Wirtseigenes PrP^{C} wird spontan und reversibel nach Einstellung von einem schnellen thermodynamischen Gleichgewicht in einen PrP^{Sc} -ähnlichen Übergangszustand umgewandelt, welcher in dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion den Kristallisationskeim angelagert wird und dessen Konformation annimmt. Die PK-Resistenz ist die Konsequenz eines durch Polymerisation von PrP^{Sc} -Molekülen entstehenden hochmolekularen Aggregats, wobei es gelungen ist, diese Aggregate experimentell

Einleitung

nachzuweisen und zu charakterisieren.

1.4 Aufgabenstellung

Ein Ziel der Arbeit war die Selektion von stabilisierten RNA-Molekülen, die das Neuropeptid Y mit hoher Selektivität und Spezifität binden können. Die Aptamer-NPY-Wechselwirkung sollte in strukturellen und funktionellen Studien umfassend charakterisiert werden. Von besonderem Interesse war die biologische Aktivität der selektierten RNA in Rezeptorsubtyp-Kompetitionsstudien als "NPY-Antagonisten". Ferner sollte deren Bindungsverhalten an NPY durch Bindungsstudien mit trunkierten und mutierten NPY-Varianten charakterisiert und mit dem Bindungsverhalten von NPY und den Rezeptorsubtypen verglichen werden. Die *in vitro* Selektion von NPY-Aptameren und deren funktionelle Untersuchung wird im **ersten Teil** dieser Arbeit beschrieben.

In früheren Arbeiten wurden Aptamere gegen das rekombinante Hamsterprionprotein selektiert (Weiss *et al.*, 1997). Diese Nukleinsäureliganden sollten im **zweiten Teil** der Arbeit vor dem Hintergrund einer diagnostischen Anwendung validiert werden. Dabei wurden erste Erkenntnisse über das Bindungsverhalten der selektierten RNA-Moleküle und deren Bindungsregion am Gesamtprotein gesammelt.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den bis dahin in der Literatur beschriebenen Charakteristika des Prionproteins wurde eine funktionell interessante und im Gesamtprotein zugängliche Region ausgewählt und als Zielmolekül für eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Peptidselektion benutzt. Der Einfluß der dabei generierten Aptamere auf die Biogenese von PrP^{Sc} und die Akkumulation von hochmolekularen PrP^{Sc} Aggregaten sollte in persistent Prion-infizierten Neuroblastomzellen untersucht werden. Die *in vitro* Selektion von Aptameren gegen einen Teilbereich des Prionproteins und die funktionelle Charakterisierung dieser Aptamere wird im **dritten Teil** dieser Arbeit beschrieben.

2 Material

2.1 Geräte und Materialien

Autoklav	MMM, Vakulab S 3000
DC-Alufolie	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Merck
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad
Entwicklermaschine	Amersham, Hyperprocessor
Filme	Kodak , Biomax
Geiger-Müller-Zähler	Berthold, LB 122, LB1200
Geldokumentationssystem	Stratagene, Eagle Eye II
Geltrockner	Bio-Rad, Modell 583
Heizblöcke	Liebisch
Magnetrührer	IKA-Combimag, REO
Membranpumpe	Vacuubrand, 4EKF63CX-4
Mikropipetten	Gilson, Pipetman
MicroSpin Columns	Pharmacia
Nitrozellulose-Acetat-Filter	Millipore, HA (0,2 µm und 0,45 µm Porengröße)
Nylonblotmembran	Ammersham, Hybond-N
PCR-Thermoblock	Biometra, Triothermoblock TB1
pH-Meter	Knick, pH-Meter 761 Calimatic
Phosphorimager	Molecular Dynamics, Storm860
Pipettenspitzen mit „Sealing Filter“	Biozym, SafeSeal-Tips
Plasmidisolierungskits	Qiagen, QIAGEN Plasmid Mini-, Maxi-Kit; QIAprep Spin Miniprep-Kit)
Reaktionsgefäßschüttler	Janke & Kunkel, Vibrax -VXR
Rotoren	Sorvall, SS34, GS3
Spannungsgeräte	Consort ,E321, E455, E734
Spektralphotometer	Kontron, Uvikon 941
Szintillationszähler	Beckman, LS 6000 TA
Thermomixer	Eppendorf ,Thermomixer 5436
UV-Handlampe	Bachofer
UV-Transilluminator	Bachofer, IL-350-L (366 nm)
Vakuumfiltrationseinheit	Millipore
Waagen	Sartorius
Westernblotapparatur	Bio-Rad, Transblot Semi Dry

Material

Vakuumkonzentrator	Bachofer
Vortex	Scientific Industries, Genie
Wasserbäder	Bachofer
Zentrifugal-Filtereinheiten	Millipore, Ultrafree-MC
Zentrifugen	Eppendorf, Zentrifuge 5417
	Heraeus, Biofuge 28RS
	Hettich, Rotanta/TRC
	Sorval, RC5C
	Ultrazentrifuge TL 100 Beckmann

2.2 Chemikalien

Bidestilliertes Wasser (H_2O_{bd}) wurde von einer Milli-Ro-Anlage (Millipore, Eschborn) entnommen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose („electrophoresis grade“)	Gibco-BRL, Eggenstein
	Seakem Biozym
Ammoniumacetat (NH_4OAc)	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniaklösung (32%)	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit (MI, USA)
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit (MI, USA)
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (MI, USA)
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
β -Mercapthoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA, Fraktion V (nuclease- and protease- free)	Calbiochem-Novabiochem, San Diego (C, USA)
1-Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Riedel de Haën, Seelze
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma, Deisenhofen

Material

Dichlordimethylsilan	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's MEM-Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Eisessig	Riedel de Haën
Ethanol, absolut	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Glaswolle, silanisiert	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Boehringer, Mannheim
Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma, deisenhofen
HEPES	Biomol, Hamburg
6-Iodoacetamidofluorescein	Molecular Probes
IPTG	Biomol, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedl-de Haen, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Merck, Darmstadt
Long Ranger Gellösung	Serva, Heidelberg
Low Melting Point Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid (MnCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt

Material

Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nonident P40 (NP40)	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc	Boehringer
Phenol, stabilisiert in TE (pH 8.0)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol	Riedel de Haën, Seelze
Roti-Load, Proteinauftragspuffer	Roth, Karlsruhe
RPMI-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Salzsäure (rauchend)	Riedel de Haën, Seelze
Sarkosyl	Merck, Darmstadt
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Spermin	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haën, Seelze
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
t RNA aus Hefe	Boehringer, Mannheim
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Fluka, Neu-Ulm

2.3 Standards und Kits

123-bp Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
λ -DNA, EcoRI/HindIII verdaut	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rainbow, Proteinlängenstandards	Amersham Buchler, Braunschweig
Smart Ladder	Eurogentec, Seraign (Belgien)
T7-Sequencing-Kit	Pharmacia, Freiburg
Western Blot Chemiluminescence	NEN-Life Science Products

Material

2.4 Enzyme und Proteine

Anti-Prionprotein Antikörper	3F4 Signit Pathologie USA Ra18 (M.Groschub, Tübingen) Ra37-15 (M.Groschub, Tübingen) Esel anti Maus IgG Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt Promega, Heidelberg
AMV Reverse Transkriptase	New England Biolabs, Schwalbach
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Boehringer, Mannheim
DNAse I (RNase-free)	Eurogentec, Seraign (Belgien)
DAP-DNA-Polymerase (Goldstar)	Sigma, Deisenhofen
Inorganic Pyrophosphatase	Merck, Darmstadt
Proteinase K	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	Promega, Heidelberg
RNASin Ribonuklease Inhibitor	GibcoBRL, Eggenstein
SuperScript Reverse Transcriptase (Rnase H ⁻)	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 Polynukleotidkinase	Stratagene, Heidelberg
T7 /SP6 RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Tth-DNA-Polymerase	

2.5 Säulenmaterial

Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Streptavidin-Agarose	Pierce, Illinois, USA
Sephadex G50 medium	Pharmacia, Freiburg
Thiolsepharose 4B	Pharmacia, Freiburg

2.6 Nukleotide und Radiochemikalien

[α - ³² P]-UTP (Aktivität 800 Ci/mmol)	NEN DuPont, Bad Homburg
[α - ³² P]-GTP (Aktivität 800 Ci/mmol)	NEN DuPont, Bad Homburg
[γ - ³² P]-ATP (Aktivität 3000 Ci/mmol)	NEN DuPont, Bad Homburg
³⁵ S Methionin/Cystein (Aktivität 1000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
N-(propionyl)[³ H]-NPY	Amersham Buchler, Braunschweig

Material

Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim Roth, Karlsruhe
Ribonukleotidtriphosphate (NTPs)	Boehringer, Mannheim Sigma, Deisenhofen
2'-Amino-2'-deoxypyrimidinnukleotide	Amersham Buchler, Braunschweig
2'-Fluoro-2'-deoxypyrimidinnukleotide	Amersham Buchler, Braunschweig

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) in HPLC-gereinigter Form oder vom Arbeitskreis Arnold bezogen.

Pool Mic Mod 40 N

PM-39-5' Primer

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGGGAAGCTTGAG-3'

PM-25-3'

3'-CTTCCTGCTCGCATGCCTAGGCTAG-5'

Mod 40N

5'-GGGAGAAAGGGAAGCTTGAG-40N-AGAAGAAGGACGAGCGTACGGATCCGATC-3'

Pool M111.1

M38.27

5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC-3'

M20.106

3'-CCGTGGTGCCAGCCTAGGTG-5'

M111.1

5'-GGAGCTCAGCCTTCACTGC-N74-GGCACCACGGTCGGATCC-3'

Material

Ap1 G→U

5'GGCTAATACGACTCACTATAGCAATGCGTTGTGTTTAATTTGATTTACGATTTTGAAGTTTTGAC
GAATGACTCATTGC-3'

2.8 Peptide

Das Neuropeptid Y (NPY) sowie die unterschiedlichen NPY-Varianten wurden im Arbeitskreis Beck-Sickinger (Leipzig), das Prion-Peptid im Arbeitskreis Arnold (München) synthetisiert.

NPY-Peptide:

NPY	Biotin- YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRYCONH ₂
NPY1-10	Biotin-YPSKPDNPGE-CONH ₂
NPY5-20	Biotin-PDNPGEDAPAEDLARY-CONH ₂
NPY25-34	Biotin-RHYINLITRQ-CONH ₂
NPY25-36	Biotin-RHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY18-28	Biotin-ARYYSALRHYI-CONH ₂
NPY18-32	Biotin-ARYYSALRHYINLIT-CONH ₂
NPY18-34	Biotin-ARYYSALRHYINLITRQ-CONH ₂
NPY [Ahx ⁵⁻²⁴]	Biotin-YPSK [5-24] RHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY13-36	Biotin-PAEDLARYYSALRHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY18-36	Biotin-ARYYSALRHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY18-36[A ¹⁹]	Biotin-AAYYALSALRHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY18-36[A ²⁵]	Biotin-ARYYSALAHYINLITRQRY-CONH ₂
NPY18-36[A ³³]	Biotin-ARYYSALRHYINLITAQRY-CONH ₂
NPY18-36[A ³⁵]	Biotin-ARYYSALRHYINLITRQAY-CONH ₂
NPY[L ³¹ , P ³⁴]	Biotin- YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLLTRPRYCONH ₂
NPY[A ³¹ , Aib ³²]	Biotin- YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLAAibRQRYCONH ₂

Material

Präselektionspeptide der NPY-Selektion:

Peptid I, pl 6,1

NH₂-WNNDNPLFKSATTTVMNPKFAES-COOH

Peptid III, pl 10

NH₂-DLREYRRFEKEKLKSQW-COOH

Prion-Peptid human 90-129:

NH₂-CQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYM-COOH-

Prion-Protein-Hamster (ohne N-terminales Signalpeptid) von *Prionics*:

MKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGTWGQPHGGGWGQPHGG
GWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAV
VGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRYPNQVYYRPVDQYNNQN
NFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRR
SS

2.9 Plasmide

Die verwendeten Vektoren pGEM-4Z und pGEM-3-Zf sind kommerziell erhältlich bei der Firma Promega (Heidelberg).

Material

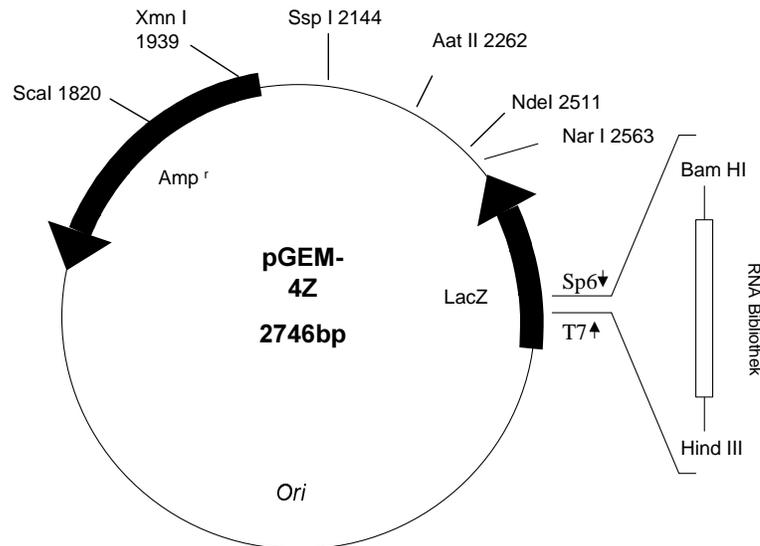


Abbildung 7 Klonierungsvektor pGEM4-Z, *amp^r*: Ampicillinresistenzgen zur Selektion positiver Klone, *ori*: Replikationsorigen, T7, SP6 Promotorsequenzen für T7 bzw. SP6 Polymerasen; der Polylinker enthält die durch HindIII und Bam HI einklonierte Bibliothekssequenz.

2.10 Bakterien

E.coli DH 5 α : ara, Δ [lac,pro], strA,thi-1, (ϕ 80dlacZ Δ M15) (Viera Messing, 1982)

XL1 Blue: recA1,endA1,gurA96,thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' traD36, proAB, lacI Δ M15, Tn10(*tet^r*)] (Bullok *et al.*, 1987)

Die Bakterien wurden aus der Stammhaltung des Arbeitskreises Winnacker entnommen.

2.11 Zelllinien

Die SK-NM-C Zellen (Neuroblastomzelllinie, exprimiert den humanen Y1-Rezeptor, hY1), die SMS-KAN-Zellen (Neuroblastomzelllinie, exprimiert den humanen Y2-Rezeptor, hY2) und die Baby Hamster Kidney Zellen (BHK-Zellen, transfiziert mit dem Y5-Rezeptor) standen im Arbeitskreis Beck-Sickinger zur Verfügung. Die persistent Prion-infizierten murinen Neuroblastomzellen (ScN₂a-Zellen) wurden aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Schätzl entnommen.

3 Methoden

3.1 Klonierungsmethoden

3.1.1 Plattenkultur

Die Aufzucht von *E. coli* Bakterien aus Flüssig- bzw. Glycerinkulturen (vgl. 3.1.2 und 3.1.3) erfolgte durch einen Ausstrich auf vorgewärmte LB-Amp-Platten und deren Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Der LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren auf 50°C abgekühlt, zur Selektion auf Plasmide mit Ampicillin und X-Gal versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Zum Vereinzeln der Bakterienkolonien wurden diese mittels Impföse gepickt und in Flüssigkultur aufgezogen.

LB-Medium: 1,0% Bacto Trypton
 1,5% Bacto Agar (bei Plattenkulturen)
 0,5% Hefeextrakt
 0,5% NaCl
 1 mM NaOH

Ampicillin Stocklösung: 50 mg/ml in H₂O
 Endkonzentration: 50 µg/ml

X-Gal Stocklösung: 40 mg/ml in DMF
 Endkonzentration: 20 µg/ml

IPTG Stocklösung: 0,1 M in H₂O
 Endkonzentration: 0,2 mM

Die Stocklösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.1.2 Flüssigkultur

Von Plattenkultur entnommene Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium übergeführt und über Nacht bei 37°C und 180-220 rpm inkubiert. Das LB-Medium wurde mit dem Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) versetzt. Die Übernachtskulturen

Methoden

dienten der Präparation von Plasmid-DNA.

3.1.3 Glycerinkultur

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 500 µl der 5 ml Übernachtskultur entnommen mit 300 µl einer 1:1 Mischung aus LB-Amp-Medium und Glycerin versetzt, vorsichtig vermischt und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5α wurden auf einer LB-Agar-Platte vereinzelt und eine Kolonie in 20 ml TYM bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,8 vermehrt. Die Suspension wurde zu 300 ml TYM gegeben und, nachdem ein OD₆₀₀-Wert von 0,6 erreicht war, wurde der Kolben rasch in einem Eis/Kochsalz-Bad auf 0°C abgekühlt. Die Bakteriensuspension zentrifugierte man im GSA-Rotor 15 min bei 4000 Upm (4°C) ab. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 ml TfB I suspendiert und 15 min bei 0°C stehengelassen. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation (3800 Upm, 5 min, 4°C, GSA). Das Pellet wurde in 20 ml TfB II resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert (je 200 µl), sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Kompetenz der Bakterien wurde durch Transformation mit einer bekannten Menge Plasmid getestet. Dabei wurden 100 µl dieser Bakteriensuspension mit 10 ng pGEM4Z-DNA transformiert. 1 µl, 25 µl und 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Aus der Anzahl der erhaltenen Kolonien pro µl des Transformationsansatzes läßt sich die Anzahl der Transformanten pro µg DNA bestimmen.

TYM-Medium:	2,0%	BactoTrypton
	0,5%	Hefeextrakt
	0,1 M	NaCl
	10 mM	MgCl ₂

Methoden

TfB I :	30 mM	KOAc	TfB II :	10 mM	MOPS
	50 mM	MnCl ₂		75 mM	CaCl ₂
	100 mM	CaCl ₂		10 mM	KCl
	15%	Glycerin		15%	Glycerin

3.1.5 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* Bakterien mischte man die Plasmid DNA mit 100 µl der frisch aufgetauten, kompetenten Zellen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 sec auf 42°C erwärmt, dann 1 min auf 0°C abgekühlt, mit 700 µl LB-Medium (auf 37°C temperiert, ohne Ampicillin) versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz jeweils zu 10% bzw. 90% auf die vorgewärmten LB-Amp-Platten (50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgte mittels kommerziellem Kit (QIAGEN Plasmid Mini-kit oder Maxi-Kit) von der Firma Qiagen (Hilden). Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und die originalen Puffer verwendet.

3.2 Arbeitstechniken im Umgang mit Nukleinsäuren

3.2.1 Analytische Trennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in nicht-denaturierenden Agarosegelen wurde in Flachgelapparaturen gemäß Sambrook *et al.* (1982) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Fragmentlänge wurden 0,7-2,0% Gele verwendet, die man durch Aufkochen einer eingewogenen Menge Agarose in 0.5 x TBE herstellte. Nach Abkühlung der Lösung auf 50°C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) wurden die Agaroselösungen in horizontale Gelschiffchen gegossen. Die DNA-Proben versetzte man mit Auftragspuffer (1 x final). Die Auftrennung der

Methoden

Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 6-8 V/cm Gellänge. Die aufgetrennte DNA konnte anschließend durch die Absorbtion des interkalierten Ethidiumbromids in einem UV-Transilluminator (*Bachhofer*) bei 366 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und fotografiert werden (*Stratagene Eagle Eye II*). Die Fragmentlänge wurde anhand geeigneter Längenstandards, wie die 123-bp Leiter für kürzere Fragmente und die mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Hind III geschnittenen λ -DNA für Plasmide abgeschätzt.

3 x Auftragspuffer: 0,05% Bromphenolblau
 0,05% Xylencyanol
 30% Glycerin

1 x TBE-Laufpuffer: 89 mM Tris
 89 mM Borsäure
 2 mM EDTA

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

3.2.2.1 Glasmilchadsorbtionsmethode

Diese Methode diente zur Aufreinigung von zu klonierenden DNA-Fragmenten nach erfolgter Restriktionshydrolyse (vgl. 3.3.9). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA (vgl.3.2.1) wurde diese im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus den Gelstückchen diente eine Variante der Glasmilchadsorbtionsmethode nach Vogelstein und Gillespie (Vogelstein und Gillespie, 1979) und zwar in Form des Quiaex-kits der Firma Quiagen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und die originalen Puffer verwendet.

3.2.2.2 Elution von DNA aus „Low-Melting-Point“-Agarosegelen

Um Plasmid- oder Oligonukleotid-DNA aufzureinigen, wurden 0,7–2%ige „Low-Melting-Point“-Agarosegele eingesetzt. Die Banden der Oligonukleotidfragmente wurden auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht, ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgläsern auf 65°C erhitzt, bis die

Methoden

Gel-Stocklösung-10 x Puffer:	8.3 M Harnstoff in 10 x TBE
Auftragspuffer:	9 M Harnstoff 50 mM EDTA (pH 8,0) 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
APS-Stocklösung:	10% in H ₂ O

3.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Um die aufgetrennten Nukleinsäuren zu identifizieren, wurde das präparative Polyacrylamidgel beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt, die mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war (*DC-Alufolie Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt*). Durch Fluoreszenzlöschung unter einer UV-Lampe bei 254 nm wird die RNA oder DNA als dunkle Bande sichtbar. Radioaktiv markierte Nukleinsäuren am 5' Ende (vgl. 3.3.13) wurden durch kurzzeitige Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert. Die betreffenden Banden wurden markiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Im Falle von radioaktiven Nukleinsäuren wurde der belichtete und entwickelte Röntgenfilm zur Orientierung paßgenau unter das Gel gelegt. Zur Elution versetzte man die zerkleinerten Gelstückchen im Fall der ss DNA Oligonukleotide und der unmodifizierten RNA mit 0,3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und im Fall der 2'-aminomodifizierten RNA mit 0,6 M Amoniumacetatlösung (pH 6,5) und ließ den Ansatz 1,5 h bei 65°C schütteln. Die Gelstückchen wurden durch eine mit silanisierter Glaswolle gestopfte Spritze abfiltriert und die Nukleinsäuren anschließend mit Ethanol präzipitiert (vgl. 3.3.2). Zur Abtrennung eventuell noch verbliebener, solider Reste wurden die wieder resuspendierten Pellets ca. 5 min bei 5.500 × g in einer Tischzentrifuge durch Ultrafree MC Filtereinheiten (*Millipore*) abzentrifugiert.

Methoden

3.3 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Extraktion mit Phenol. Dazu wurde die wässrige Lösung mit einem Volumen Phenol versetzt, gründlich durchmischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 5 min bei 21.000 x g bei RT zentrifugiert. Die wässrige obere, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang der Phenolextraktion wiederholt. Um Phenolreste zu entfernen, wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt.

3.3.2 Ethanol-Präzipitation

Die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung und weiteren Reinigung von Nukleinsäuren ist die Präzipitation mit Ethanol. In Gegenwart monovalenter Kationen bildet die DNA bzw. RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Zur Fällung von Nukleinsäuren gab man der wässrigen RNA- oder DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Volumina von eiskaltem EtOH zu und mischte gründlich. Nach 10-20 min bei -80°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert (33.000 x g, 4°C, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde anschließend mit 200 µl 70%igem EtOH gewaschen, 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes an der Luft getrocknet. Den Niederschlag löste man entweder in H₂O oder TE-Puffer. Zur Präzipitation kleiner Mengen von Nukleinsäuren (< 10 µg/ml) wurden den Ansätzen Glycogen als Carrier (Endkonzentration: 0,1 µg/ml) zugesetzt.

Bei der Präzipitation von 2' aminomodifizierter-RNA wurde anstelle von Natriumacetat 6 M Ammoniumacetat (0,5 Volumen) zugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurden die folgenden Schritte gemäß dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Methoden

3.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Gelfiltration

Um niedermolekulare Bestandteile (z.B. Salze oder Nukleotide) von den Nukleinsäurepräparationen abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Diese Materialien besitzen einen Molekularsiebeffekt, der für die Abtrennung von bestimmten Verunreinigungen von Nukleinsäurelösungen optimal ist. Dazu wurden mit Glaswolle gestopfte 1 ml-Einwegspritze mit 0,7-1 ml gequollenem Sephadex G50-Material befüllt und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß bis fast zur Trockene zentrifugiert (3.000 x g, 3 min). Nachdem man die Nukleinsäurelösung in einem Probenvolumen von 50-100 µl auf das Säulenbett aufgebracht hatte, zentrifugierte man 5 min bei 2.500 x g. Das Filtrat wurde dabei in ein 15 ml-Reaktionsgefäßes aufgefangen.

3.3.4 Übertragung von RNA auf Nylonmembranen

Zur Übertragung von radioaktiv markierter RNA aus Agarosegelen verwendete man Hybond N⁺-Nylonmembranen (*Amersham*). Die Agarosegelkammer diente nach Beendigung des Gelretardationsexperiments (vgl. 3.2.1.1) als Blotapparatur. Das Gel wurde 10 min in 7,5%iger Essigsäure fixiert und die Nylonmembran auf die Größe des Agarosegels zugeschnitten. Zum Blotten lag das Gel mit der Nylonmembran nach oben auf einem Whatmann 3MM Papier, welches die beiden Gelkammern, die mit 20×SSC gefüllt waren, verband. Auf die Nylonmembran wurden mehrere Schichten Whatmann 3MM Papier sowie eine 8-10 mm hohe Lage aus Kleenex und Papierhandtüchern gelegt. Der Aufbau wurde gleichmäßig beschwert. Nach 14 Stunden wurde die Nylonmembran getrocknet und autoradiographiert.

20 × SSC, pH7,0:

175,3g NaCl
88,2g Na-Citrat
ad. 1l H₂O

Methoden

3.3.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Eine exakte Konzentrationsbestimmung von wäßrigen Nukleinsäurelösungen erfolgte durch photometrische Absorbionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein OD-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 33 µg/ml RNA und 40 µg/ml einzelsträngiger DNA mit einer Länge von über 40 Nukleotiden bzw. 25 µg/ml bis zu 40 Nukleotiden. Für die Berechnung der Molarität wurde eine durchschnittliche Masse von 325 g/mol pro Nukleotid angenommen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anschließend unter Verwendung folgender Gleichung:

Konzentration (µg/ml) = Verdünnungsfaktor x OD x Gehalt an Nukleinsäure bei OD von 1;

Das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zeigt dabei zusätzlich die Reinheit der Nukleinsäuren. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Die Quantifizierung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde mit einem Szintillationszähler (Cherenkow-Zählung) bzw. mit Hilfe eines Phosphorimagers durchgeführt.

3.3.6 Amplifikation und enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.6.1 Reverse Transkription

Um von in den Selektionen (vgl. 3.7) erhaltenen 2'-Amino-2'-deoxy- RNA-Templaten eine DNA-Abschrift (cDNA) herzustellen, wurde eine reverse Transkriptase (Superscript™ II) verwendet. Dazu versetzte man 0,001-10 pmole RNA-Template mit 100 pmol des 3'-PCR-Primers. Zur Hybridisierung der Oligomere erhitzte man den Ansatz 3 min auf 95°C und ließ ihn dann auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend wurden Template und Primer in einem RT-Ansatz bei 42°C für 45 min inkubiert. Danach konnte die erhaltene cDNA mittels PCR amplifiziert werden (vgl. 3.3.6.2). Ein typischer 50 µl Reverse Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

10 µl 5 x RT-Puffer
2 µl DTT (SL 100 mM)

Methoden

4 µl dNTP-Mix (final 4 mM je dNTP)
1 µl Reverse Transkriptase (SL 200U/µl)
10 µl 3' PCR-Primer (final 100 pmol)
20 µl RNA (selektiert)
3 µl H₂O

5x RT-Puffer: 250 mM Tris/HCl (pH 8,3)
375 mM KCl
15 mM MgCl₂

3.3.6.2 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA (Saiki *et al.*, 1988) In dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um die durch reverse Transkription erhaltene cDNA (vgl. 3.3.6.1) unter gleichzeitiger Einführung eines T7-Promotors für *in vitro* Transkriptionsexperimente (vgl. 3.3.7, 3.3.8) zu amplifizieren. Außerdem sollten mittels PCR DNA-Fragmente für (gerichtete) Klonierungen hergestellt werden. Dazu wurden spezifische Primer synthetisiert, die an die zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankierenden Bereich des Templates hybridisieren. Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem Biometra Thermoblock in einem 100 µl Ansatz. Bei Verwendung kommerziell erhältlicher Polymerasen (z.B. Dap-DNA-Polymerase, Eurogentec) wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen gewählt. Ein Standardansatz für die während der Selektion verwendete Dap-Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 µl RT-Reaktionsansatz
10 µl 10 × PCR Puffer
10 µl 3'-Primer (final 100-200 pmol)
10 µl 5'-Primer (final 100-200 pmol)
3 µl MgCl₂ (SL 50 mM)
5 µl dNTP-Mix (final 0,2 mM je dNTP)
0,5 µl Dap-DNA-Polymerase (4U/µl)
51,5 µl H₂O

Methoden

Die Amplifikationsreaktionen umfassten typischerweise 10 bis 25 Zyklen:

1. Denaturieren der DNA: 50 sec, 94°C
2. Primer-Hybridisierung: 1-2 min, 50-60°C, je Hybridisierungstemperatur der Primer (vgl. Material)
3. Elongationsreaktion: 1-2 min, 72°C.

Die Primer wurden im großen Überschuss ($10^5 : 1$) zum DNA-Template gegeben und deren Hybridisierungstemperaturen nach Wu *et al.* berechnet (Wu *et al.*, 1991). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Template-DNA. Um die Verdunstung von Wasser bei hohen Temperaturen zu vermeiden, wurden die Ansätze mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet. Zur Überprüfung der Effizienz der Amplifikation entnahm man dem 100 µl Ansatz 5 µl und analysierte diese auf einem Agarosegel (vgl. 3.2.1.1). Bei erfolgreicher Amplifikation wurde die PCR-Reaktion beendet und die erhaltene ds DNA mit Phenol und Chloroform extrahiert und Ethanol präzipitiert (vgl. 3.3.2).

3.3.7 In vitro Transkription von 2'-Hydroxy-RNA

Zur *in vitro* Synthese von RNA wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem Bacteriophagen T7 verwendet. Die DNA-Template waren doppelsträngig und beinhalteten den T7-Promotor. Zur Herstellung radioaktiv markierter RNA setzte man den Reaktionen zusätzlich 10 - 20 µCi [α - 32 P]-GTP zu. Der Transkriptionsansatz inkubierte über Nacht, mindestens aber für 4 h im Wasserbad bei 37°C. Ein typischer 100 µl-Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

DNA-Template	10-100 pmol
Tris/HCl (pH 7,9)	40 mM
DTT	10 mM
Spermidin	6,8 mM
MgCl ₂	22 mM
Triton X 100	0,01% (v/v)
ATP, CTP, GTP und UTP	5 mM
T7 RNA-Polymerase	2 U pro µl Reaktionsansatz

Durch Zugabe von 0,5 µl DNase I (10 U/µl) wurde das DNA-Templat nach

Methoden

Beendigung der Reaktion verdaut (37°C, 15 min) und die Ansätze zur Auflösung von ausgefallenen Magnesiumpyrophosphat und darin eingeschlossenen Nukleinsäuren mit 100 µl 250 mM EDTA (pH 8,0) pro 100 µl gevortext. Danach wurde die RNA präzipitiert und durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (vgl.3.2.3) gereinigt.

3.3.8 In vitro Transkription von 2'-modifizierter RNA

Bei der Synthese von 2'-Aminomodifizierter RNA wurde nach Protokollen, welche in der Literatur beschrieben sind, vorgegangen (Fitzwater & Polisky, 1996). Zur radioaktiven Markierung wurde analog zu Kapitel 3.2.11 [α -³²P]-GTP zugegeben. Die Ansätze inkubierten über Nacht bei 37°C. Zur Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion in Richtung des Endproduktes setzte man anorganische Pyrophosphatase hinzu. Es konnte eine 2-3 fache Erhöhung der Ausbeute erzielt werden.

2'-NH₂-Transkriptionsansatz:

5 x T7-Puffer	20 µl
2'-NH ₂ -CTP	2 mM
2'-NH ₂ -UTP	2 mM
ATP	2 mM
GTP	2 mM
Inorganic	
Pyrophosphatase	2,5 U
DNA-Templat	100 pmol
T7-RNA-Polymerase	350 U
H ₂ O	ad 100 µl

Nach der Transkriptionsreaktion wurde ein DNase Verdau (5U) für 15 min bei 37°C angeschlossen und ausgefallenes Magnesiumpyrophosphat durch Zugabe von 100 µl 250 mM EDTA (pH 8,0) in Lösung gebracht. Nach Präzipitation mit Ammoniumacetat, (pH 6,5) erfolgte eine Reinigung der RNA über ein 10%iges PAA-Gel (vgl. 3.2.3).

Methoden

Um 5'-thiomodifizierte RNA für spätere Markierungen mit Fluorescein (vgl. 3.3.14) zu erzeugen, wurde die *in vitro* Transkription in Gegenwart von Guanodin-5'-phosphorthioat (GMPS) durchgeführt (Burgin und Pace, 1990). Ein typischer Ansatz enthielt 10 µl GMPS (200 mM), was einem 8-fachen molaren Überschuß im Vergleich zu den Nukleotidtriphosphaten entspricht.

3.3.9 Restriktionshydrolyse doppelsträngiger DNA

Für einen vollständigen Restriktionsverdau werden 0,2-20 µg ds DNA mit mindestens 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert. Die Spaltung erfolgte 1 h bis 4 h bei 37°C in 10-60 µl Gesamtvolumen. Unit-Definitionen und Pufferbedingungen wurden den Protokollen des Herstellers (*New England Biolabs, Schwalbach*) entnommen. Für PCR-Fragmente wurden entsprechend des höheren relativen Anteils an Restriktionsschnittstellen höhere Enzymkonzentrationen verwendet oder länger bei 37°C verdaut. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.2.1.1).

3.3.10 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Die mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde nach Maniatis *et al.* (1982) mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt. 10 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde mit 90 µl 50 mM Tris/HCl (pH8,0) versetzt und mit 0,1 units CIAP/µg DNA 1 h bei 37°C behandelt. Die alkalische Phosphatase wurde durch Zugabe von 5 µl 5 mM EDTA-Lösung und Inkubation für 1 h bei 65°C inaktiviert, die DNA anschließend phenolisiert und gefällt (vgl. 3.3.2).

Phosphatase-Puffer (1 x):	50 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl (pH 7,9)
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0.1 µg/µl BSA

Methoden

3.3.11 Ligation von doppelsträngiger DNA

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurde je nach Größe des Inserts ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:1 bis 1:7 gewählt. Als Kontrolle diente jeweils ein Ligationsansatz mit Vektor ohne Insert. Die Ligation erfolgte in Standardpuffern entweder 60-90 min bei RT oder über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert (vgl. 3.1.5).

3.3.12 5'-Dephosphorylierung von RNA

Zur Dephosphorylierung von RNA 5'-Enden inkubierte man 150 pmol RNA mit 7,5 U alkalischer Phosphatase (CIAP) bei 37°C für 15 min. Dann gab man zusätzlich 7,5 U Enzym zu und inkubierte den Ansatz für weitere 15 min bei 55°C. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die wässrige Phase ethanolpräzipitiert (vgl. 3.3.2). Da Ammoniumionen die Aktivität der Polynukleotidkinase (vgl. 3.3.13) inhibieren können, wurden die Präzipitate mehrmals mit 70%igem EtOH gewaschen und in 20 µl destillierten Wasser aufgenommen (CIAP-Puffer vgl. 3.3.10)

3.3.13 Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA

Zur radioaktiven Markierung am 5'-Ende wurden RNAs in Gegenwart von [γ -³²P]-ATP mit T4 Polynukleotidkinase behandelt. Man verwendete dabei enzymatisch dephosphorylierte Ribonukleinsäuren (vgl. 3.3.12). Die Reaktion wurde in 20 µl Volumina angesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach fällte man die Oligonukleotide mit Ethanol und trennte den Überschuss an [γ -³²P]-ATP über ein denaturierendes Polyacrylamidgel ab.

Kinasierungsansatz:

- 70 mM Tris/HCl (pH 7,6)
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM DTT
- 10 pmol Template-RNA
- 10 pmol [γ -³²P]-ATP (entspricht ca. 30 µCi)
- 20 U T4 Polynukleotidkinase

Methoden

3.3.14 Markierung von GMPS-geprimter RNA mit Fluorescein

Eine alternative Möglichkeit zur Markierung von Nukleinsäuren, neben dem radioaktivem Labeling, ist die gezielte Einführung fluoreszierender Gruppen. In dieser Arbeit sollten die *in vitro* selektierten Aptamere nachträglich mit einem Fluoreszenzmarker versehen werden, um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an NPY-Rezeptorkomplexen durchführen zu können. Zur Kopplung versetzte man die 5' thiomodifizierte RNA (vgl. 3.3.8) mit dem 300-fachem molarem Überschuss an 6-Iodoacetylaminofluorescein (6-IAF-*molecular probes*, λ_{ex} : 492 nm, λ_{em} : 516 nm). Nach 2 h Inkubation des Reaktionsansatzes bei 25°C unter Lichtausschluß wurden noch frei vorliegende Fluoresceinmoleküle durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese von der 5' fluoreszenzmarkierten RNA abgetrennt. Da Fluoreszenzmarker die Sekundärstruktur und damit das Bindungsverhalten von Aptameren beeinflussen könnten, wurde dieses in einem Filterbindungsassay untersucht (vgl. 3.5.1).

3.3.15 DNA-Sequenzierung

3.3.15.1 DNA-Denaturierung und Fällung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Man benutzte dazu einen T7-Sequenzierungs-Kit der Firma Pharmacia. Um das DNA-Template alkalisch zu denaturieren, wurden 5 μl (ca. 5 μg) der DNA-Lösung mit 2 μl NaOH (2 N) mit 5 pmol Sequenzierprimer versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte DNA mit 3 μl NaOAc (3 M) und 7 μl H₂O sowie 60 μl kaltem Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (30 min/20.000 rpm/4°C) und einmaligem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das DNA/Primer-Gemisch in 12 μl H₂O und 2 μl Hybridisierungs-Puffer aufgenommen. Zur Hybridisierung des Primers wurde der Ansatz für 5 min auf 65°C erhitzt und dann 20 min bei 37°C inkubiert.

3.3.15.2 Sequenzreaktion

Zu diesem Ansatz wurden 3 μl Labeling-Mix, 1 μl H₂O, 1 μl [α -³⁵S]-dATP (10 μCi) sowie 2 μl T7-DNA-Polymerase (1,5U/ μl) gegeben, durchmischt und maximal 5 min

Methoden

bei RT inkubiert. Zur Vorbereitung der Terminationsreaktion waren auf einer Mikrotiterplatte für jede Sequenzreaktion je 2,5 µl Terminationslösung A, C, G, und T aufgetragen und vorgewärmt worden. Nach Beendigung der Labelingreaktion wurden jeweils 4,5 µl des Labeling-Mixes mit je einer der Terminationslösungen vermischt, 5 min bei 37°C inkubiert und danach mit jeweils 5 µl Stop-Lösung terminiert. Die Sequenzansätze wurden entweder bei -20°C gelagert oder unmittelbar auf ein vorelektrophorisiertes Sequenzgel aufgetragen. Dazu wurden die Proben zunächst für ca. 3 min auf 80°C erhitzt, dann auf Eis gestellt und schließlich zwischen 3 und 7 µl auf das Sequenzgel geladen. Nach Beendigung des Gellaufes fixierte man das Gel 15-30 min in 10%iger Essigsäure, platzierte es auf ein Whatmann-Filterpapier und trocknete es bei 80°C für 2 Stunden. Die in den Sequenzreaktionen entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Hybridisierungs-Puffer: 1 M Tris/HCl (pH 7.6)
 100 mM MgCl₂
 160 mM DTT

Labeling-Mix
dGTP,dTTP,dCTP: je 7,5 µM

Terminationslösung :
ddNTP: je 8 µM
NaCl: 50 mM

Stop-Lösung: 95% Formamid (v/v)
 20 mM EDTA
 0,05% Bromphenolblau
 0,05% Xylencyanol

Methoden

3.4 Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse

3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

3.4.1.1 Proteinbestimmung nach Warburg

Der Proteingehalt von Lösungen konnte durch Bestimmung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Die Methode beruht auf der Messung des UV-Absorptionsmaximums aromatischer Aminosäuren bei 280 nm und der Nucleobasen bei 260 nm. Der Proteingehalt wurde durch Einsetzen der Extinktionswerte in folgende Gleichung errechnet:

$$\text{mg/Proteingehalt} = 1,45 \times \text{OD}_{280} - 0,74 \times \text{OD}_{260}$$

3.4.1.2 Proteinbestimmung mit dem Bioradassay

Der Biorad-Proteintest beruht auf der Beobachtung von Bradford (Bradford, 1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Bei geeigneter Wahl von Protein- und Farbstoffkonzentration besteht ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 595 nm und dem Proteingehalt der Lösung. Der Mikrottest wird in 1 ml Einwegküvetten durchgeführt und erlaubt Analysen im Bereich von 1-20 µg Protein. Es wurde eine Eichkurve im Probenpuffer mit 1-20 µg Rinderserumalbumin als Standard erstellt. Dazu wurden 0,8 ml Probe mit 0,2 ml Farbstofflösung (Coomassie Blue, Phosphorsäure, Methanol, Biorad) gemischt und nach 5 min die Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert (0,8 ml Probenpuffer, 0,2 ml Farbstofflösung) bestimmt. Mit den Proteinproben wurde analog verfahren. Die Proteinkonzentration konnte aus der Eichkurve abgelesen und der Proteingehalt der Probe unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt werden.

3.4.2 Fällern von Proteinen

Zur SDS-Gelanalyse wurden in wenigen Fällen aus verdünnten Lösungen Proteinfractionen gefällt. Die proteinhaltige Lösung wurde mit 5 Volumen eiskaltem Methanol gemischt und für mindestens 30 min auf -80°C gestellt. Anschließend wurde das Protein durch Zentrifugation (4.500 rpm/4°C/30 min) präzipitiert. Der

Methoden

Überstand wurde dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen Puffer aufgenommen.

3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur analytischen Separation von Proteinen und Peptiden wurde die denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) eingesetzt. Mit dieser von Laemmli beschriebenen Methode können Proteine ihrer Molmasse entsprechend aufgetrennt werden. Durch die Beladung der Proteine mit dem stark negativ geladenem Detergenz (SDS) wird der Einfluß unterschiedlicher Oberflächenladungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine aufgehoben. Es wurde entweder das Phast System (*Pharmacia*) mit kommerziell erhältlichen Gelen oder das Hoefer-System (*Pharmacia*) verwendet. Die Gele setzen sich aus einem zur Fokussierung dienenden Sammelgel (4% Polyacrylamid) und einem separierenden Trenngel (10 – 20% Polyacrylamid) zusammen. Vor dem Auftrag wurden die Proben teilweise sonifiziert und dann im Verhältnis 1:4 mit Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95°C erhitzt. Als Längenstandard diente „Rainbow Coloured Protein Marker“ (*Amersham*). Die Elektrophorese wurde bei 25 -30 mA durchgeführt.

Trenngellösung (20%):

Acrylamid/Bis (30 : 0,8)	20%
Tris/HCl, pH 8,8	380 mM
SDS	0,2%

Sammelgellösung (4%):

Acrylamid/Bis (30 : 0,8)	4%
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	0,2%

5 × Auftragspuffer :

Tris/HCl, pH 6,8	312 mM
Glycerin	30%
SDS	10%
β-Mercaptoethanol	25%
Bromphenolblau	0,01%
Xylencyanol	0,01%

1 × Elektrophoresepuffer :

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%

Methoden

3.4.4 Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen

3.4.4.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Um die Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Gel 15 min- 2 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und über Nacht mit einem Entfärbebeutel (*MoBiTec*) in 10%iger Essigsäure entfärbt. Diese Methode ermöglicht die Identifizierung von bis zu 30 ng Protein.

Coomassie-Färbelösung :	Coomassie Brilliant Blue	0,05%
	Essigsäure	5%
	Methanol	20%

3.4.4.2 Silber- Färbung

Das Coomassie entfärbte Gel wurde zunächst 2 × 5 min in 10%igem Ethanol, dann 3 × 3 min in H₂O gewaschen. Anschließend wurde 30 min in 0,1%iger Silbernitratlösung angefärbt, kurz mit H₂O gewaschen und dann 10 min in Entwicklerlösung geschüttelt bis die Proteinbanden deutlich angefärbt waren. Die Entwicklung wurde durch Einlegen in 1%ige Essigsäure gestoppt, das Gel dann mit H₂O und Glycerin (20%) geschwenkt. Die Silberfärbung von Phast-Gelen erfolgte nach der Vorschrift von Pharmacia (Heukeshoven und Dernick, 1988). Mit der Silberfärbung konnten Banden mit mindestens 5 ng Protein sichtbar gemacht werden.

Färbelösung :	Silbernitrat in H ₂ O	0,1%
Entwickler:	Na ₂ CO ₃	3%
	Formaldehyd	0,02%

3.4.5 Western Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper wurden die Proteine auf SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembranen oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-membranen transferiert, wo sie dann mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert wurden. Der Protein-Antikörperkomplex wurde dann mit einem zweiten Antikörper anti-IgG, an welchen eine Peroxidase gekoppelt

Methoden

war, inkubiert. Die Komplexe konnten durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase sichtbar gemacht werden.

Die proteinbeladenen, elektrophorisierten Gele wurden in der SemiPhor-Einheit (*Pharmacia*) semi dry über das elektrische Feld geblottet. Dazu wurden zunächst auf die Plattenkathode drei mit Blotting-Puffer getränkte Whatman-Filter gelegt, darauf das Gel und dann die feuchte Membran platziert. Darauf wurden nochmal drei feuchte Whatman-Filter gelegt und der Aufbau durch Auflegen der Plattenanode abgeschlossen. Es wurde 30 min bis 1 h bei 18 V geblottet.

Blottingpuffer:

Tris:	25 mM
Glycin:	192 mM
SDS:	0,1%
Methanol:	20% für PVDF 15% für Nitrozellulose

Die Membran wurde anschließend 30-60 min in 0,5% I-Bock (Tropix) in TBST (Nitrocellulosemembran) oder 5% Magermilchpulver in TBST (PVDF-Membran) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit für je 5-10 min mit TBST gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die Membran mit dem ersten spezifischen Antikörper 4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Je nach Spezifität, Affinität und Menge des Antikörpers wurden Verdünnungen zwischen 1:1000 bis 1:10000 in TBST verwendet. Anschließend wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Der zweite Antikörper, anti-IgG-POD, wurde in einer Verdünnung von 1:7500 eingesetzt und der Blot 30-60 min bei RT damit inkubiert. Nach dem dreimaligem Waschen mit TBST, wurde der Blot mit TBS oder Wasser gespült und die Proteinbanden entweder über Chemilumineszenz (*ECL-Amersham*) oder DAB -Färbung detektiert.

TBST:

Tween	0,05%
Tris/HCL, pH 7,5	20 mM
NaCl	0,9%

DAB-Lösung:

Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid	20 mg
NaCl	0,9%
H ₂ O ₂ (30%ig)	120 µl
Lösen in 20 ml Tris/HCl (50 mM, pH7,4)	

Methoden

3.4.6 Expression und Reinigung von GST-Fusionspeptiden in *E. coli*

5 ml einer Übernachtskultur wurden mit LB-Amp auf 50 ml verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₂₆₀ von 0,7-1,1 geschüttelt. Danach erfolgte die Induktion mit IPTG (100 µM) für weitere vier Stunden Inkubation bei 37°C. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4°C) und mit STE-Puffer (vorgekühlt) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml STE resuspendiert, Lysozym zugegeben (100 µg/ml) und eine Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurde DTT (5 mM) und Sarkosyl (2%) hinzugegeben und sonifiziert (3 × 15 Pulse, Stufe 4, Branson Sonifier 250). Die Suspensionen wurden zentrifugiert (20.000rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand über Glutathionsepharose gereinigt.

STE:

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

3.4.7 Reinigung über Glutathionsepharose

Die Glutathionsepharose wurde zunächst in 2% Sarkosyl in STE äquilibriert. Die Bakterienrohlysate wurden mit 300 bis 400 µl äquilibrierter Glutathionsepharose unter Zugabe von Triton X100 (1%) über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4°C) und das Zentrifugat anschließend viermal mit 20 Volumen STE gewaschen. Der Überstand wurde soweit abgenommen, daß etwa eine 1:1 Mischung der Beads in STE zurückblieb. Immobilisierte Beads konnten je nach Protein/Peptid 1-4 Wochen bei 4°C gelagert werden oder wurden sofort analysiert bzw. für Bindungsstudien verwendet.

Die Elution der gebundenen Proteine/Peptide erfolgte mit einem Sepharosevolumen Elutionspuffer. Dazu wurde die beladene Glutathionsepharose mit dem Elutionspuffer über Nacht im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert und anschließend in der Tischzentrifuge bei (2.000 rpm, 2 min, RT) abzentrifugiert. Die eluierten Proteine konnten dann im SDS-Gel analysiert bzw. für Bindungsstudien verwendet werden.

Methoden

Elutionspuffer:

Glutathion	18,3 mM
Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
Triton	0,1%
DTT	5 mM

3.5 Analyse von RNA-Protein/Peptid-Komplexen

3.5.1 Analytische Filterbindungsassays

Die Filterbindungsassays wurden sowohl zur qualitativen Analyse von RNA-Peptid/Protein Wechselwirkungen als auch zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten herangezogen. Die Reaktionen fanden in 50 µl-Maßstab mit konstanten Konzentrationen an kinasierter RNA (1,5 nM) und ansteigenden Peptid/Proteinkonzentrationen (1 nM – 10 µM) statt. Im Falle der biotinylierten Peptide wurden jeweils 20 µg Streptavidin zum Bindungsansatz hinzugegeben, um die kurzen Peptide quantitativ auf dem Filter zurückzuhalten. Zur Denaturierung der Ribonukleinsäuren wurden die Ansätze in Bindungspuffer ohne Peptid 1 min auf 90°C erhitzt, sofort auf Eis abgekühlt, mit MgCl₂ versetzt (1 mM), kurz abzentrifugiert und dann das Peptid vorsichtig beigemischt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C unter schwachem Schütteln (7.000 rpm) im Thermomixer. Anschließend wurde die komplexierte RNA über Nitrozellulosemembranen (0,45 µm, *Millipore*), die zuvor mit Bindungspuffer äquilibriert worden waren, zurückgehalten, während die ungebundenen RNA-Moleküle durch 5 ml Bindungspuffer unter Vakuum abgetrennt wurden. Die Filter wurden dann getrocknet und die zurückgehaltene Radioaktivitätsmenge mit Hilfe des Phosphorimagers (STORM860) quantifiziert und die erhaltenen Daten im Image-Quant-Analyse-Software ausgewertet.

Bindungspuffer:	K ₂ HPO ₄	0,9 mM
	NaH ₂ PO ₄	5 mM
	NaCl	70 mM
	MgCl ₂	1 mM
	KCl	1,3 mM
	Heparin	1 µg/µl

Methoden

Die Dissoziationskonstanten (K_d-Werte) für die einzelnen repräsentativen Aptamersequenzen am NPY wurden mit Hilfe folgender Gleichung und dem Computerprogramm Kaleidagraph ermittelt:

Gleichung 1

$$q = (f/2R_t) = (P_t + R_t + K_d - [(P_t + R_t + K_d)^2 - 4P_t R_t]^{1/2}) : 2$$

q ist der Anteil an im Gleichgewicht gebundener RNA. P_t und R_t sind die totalen Peptid/Protein bzw. RNA-Konzentrationen. f stellt die Effizienz an auf den Nitrozellulosefiltern zurückgehaltenen RNA-Peptid/Protein-Komplexen dar (Jellinek *et al.*, 1994).

3.5.2 Immobilisierung von Peptiden

3.5.2.1 Kopplung von NPY an Streptavidinagarose

Sowohl das Neuropeptid Y als auch alle NPY-Varianten (vgl. Material) wurden bei der Festphasensynthese N-terminal an einen Biotinrest gekoppelt. Der Streptavidin-Biotin-Komplex ist eine der affinsten in der Natur vorkommenden Wechselwirkungen mit einer Dissoziationskonstanten von 10⁻¹⁵ M. Die von Richard Soell (Gruppe Beck-Sickingen ETH-Zürich) synthetisierten und freundlicherweise zur Verfügung gestellten biotinylierten und lyophilisierten Peptide wurden in H₂O gelöst und eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Das Säulenmaterial wurde im Bindungspuffer 30 min bei 37°C äquilibriert und anschließend über Nacht mit dem Peptid (final 120 µM bis 2,5 µM) im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Kopplungseffizienz wurde sowohl spektroskopisch bei λ= 280 nm als auch durch Phastgelanalyse und anschließender Silberfärbung bestimmt und betrug ca. 93%-98%.

Bindungspuffer:

$$0,25 \times \text{PBS, pH}7,5$$

3.5.2.2 Kopplung des Prionpeptids (AS 90-129) an Thiol-Sepharose 4B

Mittels aktivierter Thiolsepharose 4B ist es möglich, Peptide mit freien Thiolgruppen unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu koppeln. Dabei wird 2-Thiopyridone freigesetzt, welches ein Maß für die Kopplungseffizienz darstellt. Die Konzentration

Methoden

des freigesetzten 2-Thiopyridons wird spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 343 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7060/\text{Mcm}$) ermittelt. 500 mg von der Sepharose 4B wurden eingewogen und in 3,5 ml entgastem H_2O aufgenommen. Anschließend wurde die gequollene Sepharose mit 60 ml entgastem H_2O gewaschen, um Stabilisatoren des gefriergetrockneten Pulvers zu entfernen, und 1 h bei 4°C in 3,5 ml Kopplungspuffer äquilibriert. Die Kopplung des N-terminal mit einem Cysteinrest synthetisierten Prionpeptides erfolgte über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler.

Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, welcher nur Sepharose enthielt und analog zum Peptidansatz behandelt wurde. Nach der Immobilisierung wurde das Sepharosematerial in eine Bio-Rad-Säule überführt und der Durchfluß spektroskopisch vermessen. Die Kopplungseffizienz lag zwischen 45%-60%. Bevor die verbleibenden 2-thiopyridyl-Reste durch die Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 4°C mit 5 mM Mercaptoethanol in NaOAc (100 mM; pH 6,0) beseitigt wurden, erfolgte ein Waschschrift mit 7 ml der 100 mM NaOAc-Lösung. Das immobilisierte Sepharosematerial konnte im Bindungspuffer maximal 14 Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Kopplungspuffer:

NaCl	500 mM
EDTA	1 mM
Tris/HCL, pH 8,4	10 mM

Bindungspuffer:

1 × PBS
Triton X100 0,1%

3.5.3 Analyse von RNA-Protein/Peptid-Komplexen durch native Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip des Gelretentionstests beruht auf der Beobachtung von Fried und Crother (Fried und Crothers, 1981), wonach Nukleinsäure-Protein-Komplexe stabil bleiben und ein anderes Laufverhalten zeigen als freies Protein und freie Nukleinsäuren. Der RNA-Protein/Peptid-Komplex retardiert aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung, der ihm von der RNA verliehen wird, schneller als das freie Protein bzw. Peptid, aber langsamer als die freie RNA.

Die Ansätze wurden folgendermaßen durchgeführt: 1-4 pmol der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP-}$

Methoden

markierten RNA wurden im Bindungspuffer für 60 s auf 95°C erhitzt und 10 min bei 4°C in Gegenwart von 1 mM MgCl₂ renaturiert. Zu den Protein bzw. Peptidlösungen wurde eine vorbereitete Pufferlösung zugegeben, um die Konzentrationen in der finalen 40 µl-Reaktion auf 1 x Bindungspuffer, 1 mM MgCl₂, 1 µg/µl BSA und 2 U/µl RNasin einzustellen. Die renaturierte RNA wurde mit den zu testenden Protein- und Peptidproben in Bindungspuffer 1 h bei 37°C inkubiert und dann mit 8 µl Auftragspuffer versetzt. Die 0,7%igen Agarosegele (*Seakam-Agarose*) wurden nach zweistündiger Polymerisation mit den 48 µl Probenansätzen beladen und bei 6V/cm und 15°C 4 Stunden lang elektrophoresiert. Die Gele wurden dann 10 min in 7,5%iger Essigsäure fixiert und die RNA auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (vgl. 3.3.4). Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Autoradiographie von BioMax MR Filmen (*Kodak*) über Nacht bei -80°C. Als Kontrolle diente die unselektierte Pool-RNA und eine nicht bindende Sequenz (z.B. # 15) (vgl. Anhang).

Bindungspuffer:	0,87 mM	K ₂ HPO ₄
	8 mM	NaH ₂ PO ₄
	136 mM	NaCl
	112,6 mM	KCl
	2 mM	DTT
	2 mM	MgCl ₂
Laufpuffer:	50 mM	Tris-Acetat, pH 8,0
	2 mM	MgCl ₂
	5 mM	β-Mercaptoethanol
Auftragspuffer:	40%	Glycerin
	0,6 ×	PBS

3.5.4 Gel-Retardation von zellulärem Prionprotein aus Hirnhomogenaten

Um zu zeigen, daß die *in vitro* selektierten Aptamere in der Lage sind, auch zelluläres Prionprotein in komplexen Proteingemischen wie Hirnhomogenaten, spezifisch zu erkennen, wurden Gelretardationsanalysen mit [α -³²P]-GTP-markierten

Methoden

Aptameren in Gegenwart von Hirnhomogenaten und Prionprotein-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die radioaktiv markierte RNA sollte bei der Gelelektrophorese in nativen Agarosegelen durch die Bindung ihres Zielproteins ein verändertes Laufverhalten aufweisen. Ein zusätzlich für das Zielprotein hinzugegebener spezifischer Antikörper führt zu einem trimeren Komplex und wird im Gel noch weiter zurückgehalten (sogenannter Supershift). Die Gehirnhomogenate wurden freundlicherweise von C.I. Lasmezas (Commissariat A l' Energie Atomique, Fontenay-aux-Roses, France) zur Verfügung gestellt. Vor Verwendung der Gehirnhomogenate in den Gelretardationassays wurden sie folgendermassen vorbehandelt: Die präparierten Gehirnhemisphären von Maus, Knock-out Maus, Hamster und Rind wurden zu 20%(w/v) mittels einer 5%igen Glucoselösung verdünnt. Danach folgte eine nochmalige Verdünnung auf 5% (w/v) in Bindungspuffer (vgl.3.5.3) unter Zusatz von PMSF (1 mM final). Der Ansatz wurde zur Abtrennung unlöslicher, aggregierter Bestandteile bei 12.000 rpm für 15 min und 4°C abzentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde in den Gelretardationexperimenten verwendet.

Für die Supershiftexperimente wurden zwei polyklonale, Prionprotein-spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper Ra18 und Ra37-15 sind gegen das N-terminale Prionproteinepitop AS 37-53 bzw. gegen das C-terminale Epitop AS 206-225 gerichtet. Als Kontrolle diente das Präimmunserum. Diese Antikörper und das Präimmunserum wurden mit den Hirnhomogenaten auf Eis präinkubiert. In den Reaktionen ohne Antikörper oder Präimmunserum wurden die entsprechenden Volumina durch 1 x Bindungspuffer (vgl. 3.5.3) ersetzt. Nach 60 min Präinkubation setzte man 2 pmol [α -³²P]-GTP-markiertes Aptamer hinzu und inkubierte nochmals 45 min bei 37°C. Um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren, wurde zu den Ansätzen jeweils 5 µg Hefe tRNA zugegeben. Die Analyse der Komplexe erfolgte analog der unter 3.5.3 beschriebenen Methode.

Methoden

3.5.5 Bestimmung der Dissoziationskonstanten eines selektierten Aptamers durch analytische Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Bei der Durchführung der Affinitätschromatographie orientiert man sich an den allgemeinen Schritten: Adsorption der Probe, Waschen, Desorption und Regeneration. Für die Adsorption spielen die Bindungskonstante und die Kapazität der Säule eine wesentliche Rolle (Lottspeich, 1998). In dieser Arbeit sollte die Dissoziationskonstante des affinsten Liganden, welcher zur Charakterisierung der NPY-Rezeptorinteraktion im Zellsystem vorgesehen war, nochmals mit einer zweiten Methode verifiziert werden. 300 µl NPY-Streptavidinagarosematerial (120 µM) wurde luftblasenfrei in eine 1 ml Spritze gefüllt, welche am unteren Ende mit Glaswolle abgedichtet wurde. Es war darauf zu achten, ein Trockenlaufen des Säulenmaterials zu vermeiden. Zuerst äquilibrierte man die Affinitätsmatrix im Bindungspuffer (vgl. 3.5.1) und stellte den optimalen pH-Wert von 7,6 und die MgCl₂ Konzentration von 1 mM sicher. Anschließend wurden 50 pmol [α -³²P]-GTP-markierte RNA in einem Volumen von 50 µl Bindungspuffer, in welchem sie de- und renaturiert wurde, auf die derivatisierte Streptavidinagarose aufgetragen. Um eine möglichst scharfe Peakabtrennung zu gewährleisten, wurde die Säule mit dem derivatisierten Sepharosematerial mit einem kleinen Durchmesser von 5 mm und einer Füllhöhe von 6 cm präpariert. Anschließend wurde mit Bindungspuffer gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr auf der Säule zu detektieren war. Der Durchlauf wurde in Fraktionen von 250 µl bis 1000 µl Bindungspuffer gesammelt und die Radioaktivitätsmenge für jede Fraktion im Scintillationszähler bestimmt. Die Elutionsprofile wurden danach durch Addition der absoluten radioaktiven Werte (y-Achse) gegen das entsprechende Elutionsvolumen (x-Achse) aufgetragen. Dabei wurden die ersten Waschfraktionen, welche nicht bindende RNA enthielten, nicht berücksichtigt. Anhand der Elutionsprofile wurde das Elutionsvolumen (V) bestimmt, bei dem die Hälfte der an NPY (L) gebundenen Aptamere wieder von der Affinitätsmatrix eluiert werden konnte.

Methoden

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach folgender Gleichung (Dean, 1995):

Gleichung 2

$$Kd = \frac{(V - V_m) \times [L]}{V - V_0}$$

- [L] = Konzentration des auf der Affinitätsmatrix immobilisierten Peptides.
- V = Das Elutionsvolumen des Liganden entspricht dem Waschvolumen mit Bindungspuffer, bei dem die Hälfte des an die Affinitätsmatrix gebundenen Liganden wieder von der Säule eluiert ist.
- V₀ = Totales penetrierbares Volumen der Säule. Es wurde anhand des Elutionsvolumens von unspezifischen RNA Molekülen (Pool Mic Pmod1-40N) ermittelt.
- V_m = Das Gelausschluß-Volumen wurde anhand der Elutionsspitze eines die Sepharose-Matrix nicht penetrierenden Moleküls (Dextran Blau) ermittelt.
- Kd = Dissotiationskonstante des Liganden (RNA-Aptamer) an das auf der Matrix immobilisierte Zielmolekül (Peptid).

3.6 Arbeitstechniken im Umgang mit Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Zelllinien wurden bei 37°C im Brutschrank unter 5% CO₂ kultiviert. Die Scrapie infizierten Neuroblastom-Zellen wuchsen auf 10 cm Petrischalen in Dulbecco's MEM-Medium. Abhängig von ihrer Wachstumsdichte passagierte man die Zellen, um die Zellzahl von ca. 8 x 10⁶ pro Schale zu gewährleisten. Zur längeren Aufbewahrung bzw. Passage der Zellen wurden diese nach einmaligem Waschen mit 5 ml PBS durch Zugabe von 1 ml einer Trypsin-EDTA Lösung 5 min im Brutschrank bei 37°C abgelöst. Die sich ablösenden Zellen wurden in 5 ml DMEM aufgenommen und in neue Kulturschalen mit Medium gegeben. Bei einer Verteilung von 1:3 oder 1:20 auf neue Schalen konnte nach 24 h bzw. nach ca. einer Woche wieder gute Konfluenz erreicht werden. Um die Zellen länger aufzubewahren, wurden diese nach der Trypsinierung in 5 ml DMEM-

Methoden

Gefriermedium aufgenommen, welches zusätzlich 20-40% FKS und 10% DMSO enthielt. Danach wurden die Zellen über Nacht bei -70°C und dann in flüssigem Stickstoff (-183°C) aufbewahrt.

Für die Bindungsstudien mit den NPY-Aptameren an funktionellen NPY-Rezeptoren wurden drei adhärenzte Zelllinien, welche unterschiedliche NPY-Rezeptorsubtypen exprimieren, in 75 cm² Flaschen kultiviert. SK-NM-C Zellen (Neuroblastomzelllinie, exprimiert den humanen Y1-Rezeptor, hY1) wurden in MEM-ear'ls salt Medium kultiviert, die SMS-KAN-Zellen (Neuroblastomzelllinie, exprimiert den humanen Y2-Rezeptor, hY2) wuchsen in Nut-MIX HAM's F-12DMEM-Medium und die Baby Hamster Kidney Zellen (BHK-Zellen), welche transfiziert waren mit dem humanen Y5-Rezeptor (rY5), wurden in DMEM-Medium kultiviert. Hatten die Zellen eine 100%ige Konfluenz erreicht, wurden sie zur weiteren Verwendung entweder mittels 0,02% EDTA in Phosphatpuffer (SK-NM-C und SMS-KAN) oder durch Zugabe von 1 ml einer Trypsin-EDTA Lösung im Falle der BHK-Zellen abgelöst.

Zellkulturreagenzien:

FKS:	Jede Charge wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert und bei 4°C gelagert.
Dulbecco's MEM-Medium:	DMEM mit 10% (v/v) FKS, Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml, 4 mM L-Glutamin und im Falle der BHK-Zellen Fungizon 25 µg/ml
Trypsin-EDTA Lösung:	1 x = 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A, GibcoBRL
DMEM-Gefriermedium:	supplementiert mit Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml, 4mM L-Glutamin, 20-40% (v/v) FKS und 10% DMSO
MEM-ear'ls salt Medium:	supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 4 mM L-Glutamin, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren und 1 mM Pyruvat
Nut-MIX HAM's F-12DMEM-Medium:	supplementiert mit 15% (v/v) FKS, 1% (v/v) L-Glutamin und 1% (v/v) nicht essentiellen Aminosäuren

Methoden

3.6.1 Präparation von PrP^{Sc} aus Scrapie infizierten Neuroblastomzellen (N_{2a}-Zellen)

Die bis zur Konfluenz gewachsenen N_{2a} Zellen wurden mit 5 ml PBS (Dulbecco's PBS) gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Lysispuffer lysiert. Nach 10 minütiger Inkubation unter mehrmaligem Schwenken wurde das Zellysate in ein 1 ml Eppendorfgefäß überführt und zur Entfernung der Kern- und Membranbestandteile 5 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde 30 min bei 37°C einem Proteinase K-Verdau (20 µg/ml) unterzogen. Um eine weitere Proteindegradation zu verhindern, wurden dem 500 µl Ansatz folgende Proteaseinhibitoren zugegeben: 10 µl Aprotinin (SL 14 mg in 5ml EtOH) und 10 µl Pefabloc (SL 50 mM in Wasser). Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Sarkosyl (SL 10%) und eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g, 1 h bei 4°C im TLA 45 Rotor (Beckmann TL 100). Durch den Ultrazentrifugationsschritt wurden sowohl noch restliches, lösliches PrP^C, als auch Proteinase K und andere lösliche Proteine von dem schwer löslichen PrP^{Sc}, welches unter diesen Bedingungen quantitativ pelletiert, abgetrennt. Die PrP^{Sc}-Pellets waren über einen Zeitraum von 3 Monaten bei -20°C haltbar oder wurden direkt mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließendem Westernblot (vgl. 3.4.5) analysiert. Dafür wurden die PrP^{Sc}-haltigen Pellets in 50 µl TNE Puffer aufgenommen.

Lysispuffer:

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
Triton X100 (v/v)	0,5%
DOC (v/v)	0,5%

TNE-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM

Methoden

3.6.2 *Kompetition der Bindung von NPY an seine Rezeptoren durch NPY-Aptamere auf Zellen*

In dieser Versuchsreihe sollte getestet werden, ob die *in vitro* selektierten Aptamere die Bindung von NPY an verschiedene funktionelle Rezeptorsubtypen auf lebenden Zellen inhibieren können. Dabei wurden SK-N-MC Zellen, welche den human Y1 Rezeptor (hY1) exprimieren, SMS-KAN Zellen, welche den human Y2 Rezeptor (hY2) exprimieren, und BHK Zellen, die mit dem human Y5 Rezeptor transfiziert worden waren (rY5), näher untersucht. Die adhärenz bis zur Konfluenz gewachsenen Zellen wurden wie beschrieben (vgl. 3.6) abgelöst und in MEM-Puffer, welcher zwei Proteaseinhibitoren Pefabloc 1% (v/v), Bacitracin 1% (v/v) und 1% BSA (v/v) enthielt, aufgenommen. Für die Rezeptor-Ligand-Kompetitionsstudien war die Bestimmung der Wachstumsdichte der Zellen vor jedem Experiment zur exakten Zellzahleinstellung von 2 Millionen Zellen/ml notwendig und erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Nach dem Auszählen zweier großer Quadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, wurde der Mittelwert mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert, um die tatsächliche Zellzahl pro ml zu erhalten. Für jeden Rezeptortyp wurden mindestens drei unabhängige Kompetitionskurven erstellt, wobei für jede Aptamerkonzentration eine Triplet-Bestimmung durchgeführt wurde. Die Konzentration des [^3H]-propionyl-markierten Liganden-NPY blieb konstant und betrug pro Ansatz 1 nM oder 2 nM. Eine N-(propionyl) [^3H]-NPY Stammlösung (10^{-8} M) wurde in einer 1%igen BSA Lösung vor jeder Messung frisch vorbereitet. Ein typischer 250 μl Kompetitionsansatz setzte sich folgendermassen zusammen: 25 μl Aptamer, 25 μl ^3H -NPY, 2,5 μl Heparin (final 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 200 μl Zellsuspension in MEM-Puffer (500.000 Zellen). Die Aptamere wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (final 1 nM bis 1 μM) im Bindungspuffer (vgl. 3.5.1) de- und renaturiert und in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 μl ^3H -NPY und der 200 μl Zellsuspension. Nach 90 min Inkubation bei RT und leichtem Schwenken bei 250 rpm, wurde der Ansatz bei 3.200 rpm, 5 min und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 400 μl vorgekühltem PBS gewaschen (4°C). Es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation bei 3.200 rpm, 5 min und 4°C. Nach Entfernung des Überstandes

Methoden

wurde das Zellpellet mit dem rezeptorgebundenen, ^3H markiertem NPY in 100 μl PBS resuspendiert, in ein Szintillationsvial überführt und mit 3 ml Gold-cocktail versetzt. Die Radioaktivitätsmenge wurde im γ -Counter bestimmt, die Messzeit pro Vial betrug ca. 10 min. Bei dem Ansatz zur Bestimmung der totalen Bindung wurden anstelle der Aptamerlösung 25 μl Bindungspuffer hinzupipettiert und zur Bestimmung der unspezifischen Bindung 25 μl 10^{-5} M unmarkiertes NPY, d.h. ein 1000-facher molarer Überschuss im Verhältnis zu dem radioaktiv markierten NPY (1 nM).

3.6.3 *In vitro* Konversion

Die *in vitro* Konversionsexperimente wurden von Suezette Priola (USA Hamilton) nach dem folgendem Protokoll durchgeführt: PrP^{Sc} wurde ohne PK-Behandlung aus Hamstergehirnen präpariert, welche mit dem Stamm 263 K infiziert worden waren (Caughey *et al.*, 1991). 200 ng von PrP^{Sc} wurden mit 2 ng ^{35}S markiertem Hamster PrP^C (ohne GPI-Anker) in Gegenwart von 0,35 μM oder 3,5 μM Aptamer RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 μl inkubiert. Kontrollansätze waren sowohl unselektierte Pool-RNA als auch ein Ansatz ohne RNA. Die RNA wurde de- und renaturiert, dem Reaktionsansatz bestehend aus 200 ng PrP^{Sc} und 2 ng PrP^C hinzugegeben und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde ein Zehntel des Ansatzes mit 4 Volumen Methanol und 20 μg Thyroglobulin als Carrier gefällt (-PK-Behandlung). Die verbleibenden neun Zehntel wurden 60 min bei 37°C mit Proteinase K (PK) behandelt (Verhältnis von PK : Protein = 6 : 1), anschließend die Reaktion mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc (2 mM) abgestoppt. Danach erfolgte die Präzipitation mit 4 Volumen Methanol und 20 μg Thyroglobulin. Die Proben wurden auf einem 16%igem PAA-Gel aufgetragen und die Menge an ^{35}S markiertem PK-resistenten Material im Phosphorimager (*Molecular Dynamics*) quantifiziert.

Reaktionspuffer A: 200 mM KCl
5 mM MgCl₂
1,25% Sarkosyl
50 mM Citratpuffer (pH 6,0)

Methoden

Reaktionspuffer B: 75 mM NaCl
1 mM MgCl₂
1 µg/µl Heparin
600 mM KH₂PO₄/ 1,5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)

3.6.4 Analyse des de novo synthetisierten PrP^{Sc}'s aus Scrapie infizierten Neuroblastomzellen

Die Zellen wurden 1-2 Tage vor Verwendung passagiert und in 6 cm Petrischalen ausgesät. Nach 1-2 Tagen waren sie bis zu einer 70%igen Konfluenz gewachsen, der Zellüberstand wurde in 1N NaOH entsorgt und die Zellen wurden in Methionin und Cystein freiem RPMI Medium (1% FKS) im Brutschrank ausgehungert. Nach 30 min erfolgte die Zugabe von im Bindungspuffer (vgl. 3.6.3, B) de- und renaturierter RNA, wobei im Medium eine Konzentration von 0,35 µM eingestellt wurde. Die unselektierte Pool-RNA und ein Ansatz ohne RNA-Zusatz wurde als Kontrolle mitgeführt. Da Zellsysteme von hoher Komplexität sind und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden muss, wurden für jeden Ansatz mindestens Tripletbestimmungen (jeweils drei 6 cm Schalen für die Aptamer-RNA, die Pool-RNA und den Kontrollansatz ohne RNA) vorgenommen. Nach 45 min Inkubation wurde den Zellschalen 800 µCi ³⁵S Methionin/Cystein und dialysiertes FKS (final 3%) zugesetzt, um die Translationsmaschinerie nicht weiter zu blockieren. Eine zweite Zugabe der RNA erfolgte nach 4 Stunden, so daß am Ende eine Konzentration von 0,7 µMRNA im Medium vorlag.

Nach 12 Stunden wurden die Zellen lysiert (vgl. 3.6), kurz abzentrifugiert und die postnukleären Überstände zu jeweils 500 µl aufgeteilt. Ein Teil wurde 30 min bei 37°C einem Proteinase K-Verdau (20 µg/ml) unterzogen. Vor dem Ultrazentrifugationsschritt setzte man Proteaseinhibitoren 10 µl Aprotinin (SL 14 mg in 5 ml EtOH), 10 µl Pefabloc (SL 50 mM in Wasser und 50 µl Sarkosyl (SL 10%) hinzu und zentrifugierte 1 h bei 100.000 g und 4°C im TLA 45 Rotor. Die Pellets wurden in 100 µl Waschpuffer/SDS resuspendiert, 10 min bei 95°C aufgeköcht, kurz auf Eis gestellt, mit 900 µl Waschpuffer/Sarkosyl und 3 µl monoklonalen PrP-

Methoden

Antikörper 3F4 über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Protein-A-Sepharose (150 mg/ml) und eine erneute Inkubation für 90 min im Überkopfschüttler im Kühlraum. Anschließend wurden die Ansätze 5 mal mit 300 µl Waschpuffer/SDS behandelt, wobei die Sepharose nach jedem Waschschrift für 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 20 µl 0,1M EtSH/SDS (w/v) 0,5% resuspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht, der Überstand abgenommen und in 20 µl Lysispuffer (vgl. 3.6.1) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Deglykosylierung der di- und monoglykosylierten PrP-Form durch Zusatz von 5 µl N-Glykosidase F (5 Units) über Nacht bei 37°C und eine Analyse der unglykosylierten PrP-Form auf einem SDS-Gel (12,5%). Nach beendeter Elektrophorese (vgl. 3.4.3) wurde das Gel 2 h bei 80°C getrocknet und ein Röntgenfilm 1 Tag, 7 Tage bzw. 4 Wochen exponiert. Der Phosphorimager diente der quantitativen Auswertung des ³⁵S-Signals.

Waschpuffer:

Triton X-100:	0,5%
Desoxycholat:	0,5% in PBS
entweder +	1% SDS (w/v)
oder +	1% Sarkosyl (w/v)

3× SEB-Puffer:

0,25 ml Tris/HCl, pH6,8, 1 M
1 ml Glycerin (100%)
1 ml SDS (20%)
0,5 ml EtSH
ad. 3 ml H ₂ O
0,01% Bromphenolblau

3.7 In vitro Selektion

Ausgangspunkt für beide *in vitro* Selektionen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, war eine kombinatorische DNA-Bibliothek (Mic Mod 40N), welche freundlicherweise von Herrn M. Blind (Arbeitskreis Prof. M. Famulok) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Nukleinsäurebibliothek ist so konzipiert, daß sie sowohl für Selektionen mit 2' Hydroxy-Ribonukleinsäuren als auch für 2' modifizierten (2'-Amino- oder 2'-Fluoro)-Ribonukleinsäuren geeignet wäre. Für eine effektive Transkription der Templates mit 2' modifizierten Nukleotiden wurden Pyrimidinbasen innerhalb der ersten 12 Positionen vermieden (vgl. Abb. 8). Ebenso enthalten die RNA-Moleküle an der Initiationsstelle der reversen Transkription in ihren 3'-

Methoden

konstanten Bereichen Purine, um die Polymerasereaktion des Enzyms zu fördern (Blind, 2000).

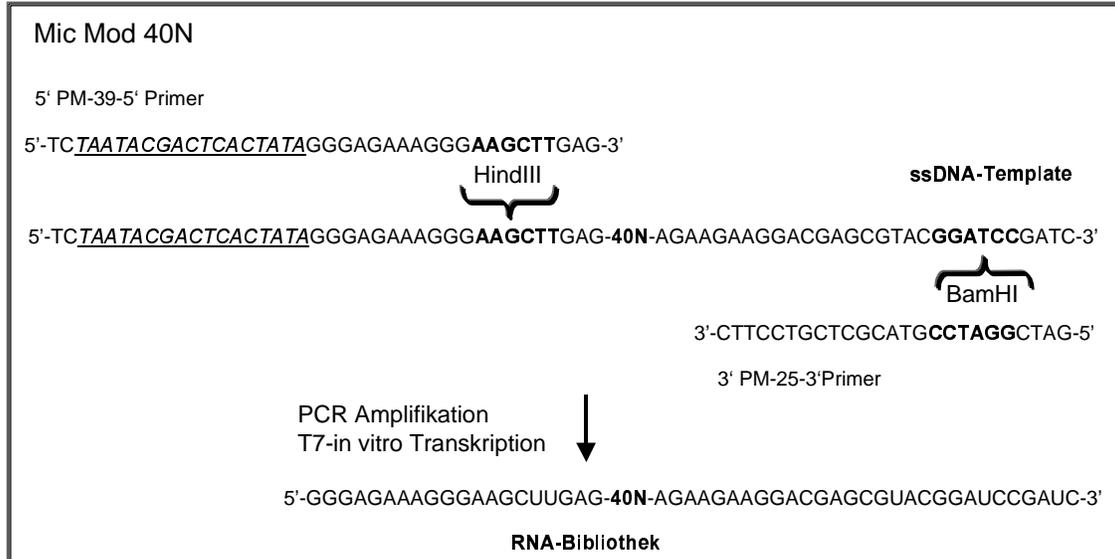


Abbildung 8 Die kombinatorische DNA- und RNA-Bibliothek des Mic Mod 40N-Pools. Nach PCR-Amplifikation der ss-DNA-Templates mittels des 5'-Primer's PM-39-5' und des 3'-Primer's PM-25-3' ist die erhaltene ds DNA Ausgangspunkt für die in vitro Transkription der RNA-Bibliothek, kursiv und unterstrichen: T7-RNA-Polymerase-Promotor zur Transkription der RNA Bibliotheken, fett: Restriktionsschnittstellen, N40 stellt den randomisierten Bereich von 40 Basen dar, wobei alle Basen im gleichen Verhältnis zueinander in der Sythese des ss-DNA-Templates vorlagen. Der N40-Bereich ist flankiert von konstanten Sequenzabschnitten, die die Primerbindestellen für die enzymatische Amplifikation in der reversen Transkriptionsreaktion und PCR-Reaktion darstellen.

3.7.1 Die in vitro Selektion am Neuropeptid Y

Vor jedem Selektionsschritt wurde die radioaktiv markierte RNA-Bibliothek bei 90°C für 2 min in Magnesium-freiem Selektionspuffer denaturiert und anschließend auf Eis 10 min renaturiert. Dabei stellte man die MgCl₂ -Konzentration im Puffer auf 1 mM final ein, um die Faltung und Stabilisierung von RNA-Strukturen zu gewährleisten. Das Targetpeptid NPY, welches freundlicherweise von der Gruppe von Prof. A. Beck-Sickinger (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde, war über einen N-terminalen Biotinrest an Streptavidinagarose immobilisiert und lag je nach

Methoden

Selektionszyklus im Konzentrationsbereich von 26 μM bis 2,5 μM bezogen auf das Endvolumen des Reaktionsansatzes vor (vgl. Abb. 11, Tab. 5).

Um die Anreicherung von unspezifischen, die Matrix bindenden Sequenzen zu vermeiden, wurden die Selektionsbibliotheken in den ersten sechs Zyklen entweder mit underivatisierten Sepharosematerial oder darauffolgend durch Verwendung von synthetischen, biotinylierten Peptiden unterschiedlicher Ladung, welche ebenfalls an Streptavidinagarose gekoppelt waren (Zyklus 7-9), präselektiert. Die Sequenzen dieser Peptide und die entsprechenden pI-Werte sind im Materialteil angegeben. Die einzelnen Präselektionsfraktionen wurden im Scintillationszähler quantifiziert, wobei die ersten beiden gesammelten Durchflüsse an ungebundener RNA in den anschließenden Selektionsschritt eingesetzt wurden. Das Targetpeptid und die präselektierte RNA inkubierte man in jedem Selektionszyklus 1 h bei 37°C im Thermomixer (11.000 rpm). Dabei war darauf zu achten, daß sich das Säulenmaterial nicht am Boden des Reaktionsgefäßes absetzte. Danach platzierte man den Ansatz in eine Bioradsäule und trennte die nicht bindenden Nukleinsäuren durch Waschen mit dem Bindungspuffer ab. Um sehr spezifische NPY-Aptamere anzureichern, wurden die Wasch- und Inkubationsbedingungen nach dem 6. Zyklus stark variiert (vgl. Abb. 12, Tab. 6). Die NPY gebundene Fraktion wurde mit 7 M Harnstoff und 3 mM EDTA eluiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroformextraktion der RNA, Ethanolpräzipitation in Gegenwart von 20 μg Glykogen, eine reverse Transkription, PCR-Amplifikation und *in vitro* Transkription, um die Selektionsbibliothek für den folgenden Zyklus vorzubereiten (vgl. 3.3.6, 3.3.8).

1 \times Selektionspuffer, pH 7,4 (GIBCO):

155 mM NaCl

1,1 mM KH_2PO_4

3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

1 mM MgCl_2

Methoden

3.7.2 Selektion von Prionpeptid 90-129-spezifischen Aptameren

Bei der Selektion von Prionpeptid spezifischen Aptameren wurden wie in der bereits beschriebenen NPY-Selektion der Pool Mic Mod 40N sowie 2'-Amino-2'-deoxy modifizierte Pyrimidinbausteine verwendet. Die De- und Renaturierung der RNA, die reverse Transkription und PCR-Amplifikation erfolgte nach den Prinzipien der NPY-Selektion (vgl. 3.7.1).

Das an aktivierte Thiol Sepharose 4B gekoppelte Prion-Peptid wurde in Bindungspuffer (1 × PBS) mit der an Thiolsepharose präselektierten, [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP markierten RNA 1 h bei 37°C im Thermomixer (11.000 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Bioradsäule überführt und mit 100 bzw. 1000 Säulenvolumen 1 × PBS gewaschen (vgl. Abb. 30, Tab. 8). Die Elution erfolgte entweder unspezifisch mittels SDS-Probenpuffer (Zyklus 1-9a) oder spezifisch durch Spaltung der Disulfidbrücke zwischen dem Peptid und der Thiol Sepharose mittels 500 mM DTT (Zyklus 9b-11b). Das Eluat wurde zweimal mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, mit 100%igem Ethanol gefällt, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, in Wasser resuspendiert und wie bereits beschrieben weiter verarbeitet (vgl. 3.7.1).

SDS-Probenpuffer (4 × Laemmli):

200 mM Tris/HCl, pH6,8

40% (v/v) Glycerin

4% (v/v) SDS

400 mM DTT

4 Ergebnisse

→ 4.1 *In vitro* Selektion

→ 4.2 *In vitro* Selektion von Neuropeptid Y (NPY) spezifischen RNA-Molekülen und deren funktionelle Charakterisierung

→ 4.3 Charakterisierung von Prionprotein spezifischen Aptameren

→ 4.4 *In vitro* Selektion von RNA-Molekülen an einer ausgewählten Region des humanen Prionproteins (AS 90-129) und deren funktionelle Charakterisierung

4.1 *In vitro* Selektion

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Selektionsexperimente gegen das Neuropeptid Y (NPY) und das Prionpreptid 90-129 wurde der Pool Mic Mod 40N verwendet (vgl. Abb. 8). Durch die spezielle Konstruktion des Pools war es möglich, die beiden Selektionen mit 2'-Amino-2'-deoxy-modifizierten RNA-Molekülen durchzuführen (vgl. 3.7). Diese Modifikation der RNA erhöht deren Stabilität gegen die Mehrheit der im Serum vorkommenden Ribonukleasen (Jellinek, *et al.*, 1995), eine Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung der Aptamere in biologischen Systemen.

Die DNA-Bibliothek-Mic Mod 40N enthält einen randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden, welcher am 3' und 5' Ende von invarianten Primerbindestellen für die nach jedem Selektionszyklus durchgeführte reverse Transkription und PCR-Amplifikation flankiert ist. Über den 5'-Primer wird zudem der für die *in vitro* Transkription erforderliche T7-Promotor eingeführt (vgl. Abb. 9). Die Komplexität der Nukleinsäurebibliothek beträgt ca. $8,8 \times 10^{15}$ verschiedene Moleküle (Blind, 2000). Durch ein Affinitätschromatographisches Verfahren konnten die spezifisch bindenden Aptamere an einer mit dem Zielmolekül derivatisierten Sepharosematrix angereichert werden. Durch einen Präselektionschritt mit der doppelten Menge an Vorsäulenmaterial verglichen zur mit NPY oder PrP90-129 immobilisierten Sepharose wurden diejenigen RNA-Moleküle entfernt, die unspezifisch an das Trägermaterial binden.

Ergebnisse

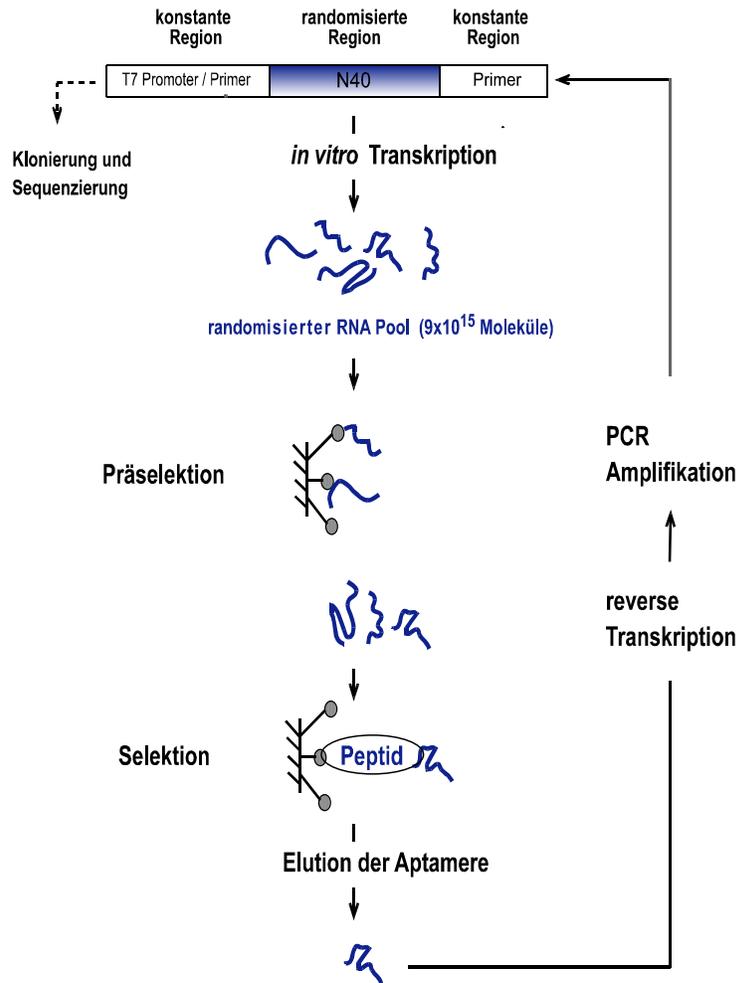


Abbildung 9 Schema zur Isolierung von NPY- bzw. Prionprotein-spezifischen Aptameren durch einen affinitätschromatographischen Prozess.

Ergebnisse

4.2 In vitro Selektion von Neuropeptid Y (NPY) spezifischen RNA-Molekülen und deren funktionelle Charakterisierung

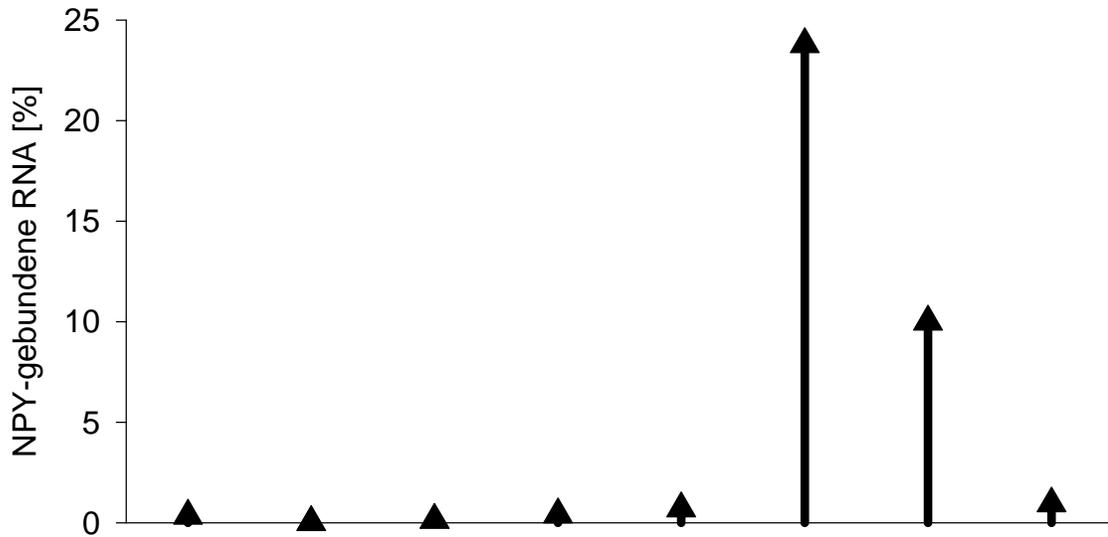
4.2.1 Der Verlauf der in vitro Selektion

In der ersten Selektionsrunde wurde eine radioaktiv markierte RNA-Bibliothek von 3,75 nmol (ca. 2,3 Pool-Kopien) mit dem N-terminal immobilisierten NPY (vgl. Abb. 10) inkubiert, nachdem die Vorsäulenbinder (Streptavidinagarosebinder) durch die Präselektion abgetrennt worden waren. Damit ist statistisch davon auszugehen, daß von jeder Sequenz zwei Kandidaten im Ausgangspool repräsentiert sind. Durch den Waschschrift mit 100 Säulenvolumen Selektionspuffer wurden die nicht bindenden RNA-Moleküle entfernt. Anschließend wurden die 0,34% (bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten radioaktiv markierten RNA) der an NPY gebundenen, funktionellen Sequenzen unter denaturierenden Bedingungen eluiert (vgl. 3.7.1). In den folgenden Selektionsrunden (Zyklus 2 bis 6) wurde sowohl die RNA-Konzentration (500 pmol = 3,3 µM) als auch die NPY-Konzentration (26 µM) weitgehend konstant gehalten. Ein detaillierter Überblick über die Elutionsergebnisse sowie die Inkubations- und Waschbedingungen der ersten sechs Selektionszyklen ist in Abb. 11 dargestellt. Eine unspezifische Bindung der Nukleinsäurebibliotheken an das underivatisierte Säulenmaterial konnte im Verlauf der gesamten Selektion nicht detektiert werden (Tab. 5 und 6)



Abbildung 10 Selektionstarget NPY, N-terminal biotinyliert und immobilisiert an Streptavidinagarose

Ergebnisse



Selektionszyklus	1	2	3	4	5	6a	6b	6c	
RNA-Konz.	13 μ M	3,3 μ M	→						
NPY-Konz.	26 μ M	→						5 μ M	5 μ M
Präselektionsmaterial	Strept.-agarose	→							
Inkubationsbedingungen	1 \times PBS	→							300 mM NaCl in 1 \times PBS
Washbedingungen	100 SV 1 \times PBS	→							650 SV 1 \times PBS (+300, 750 mM NaCl, 1%Triton)
RNA-NPY [%]	0,34	0,029	0,14	0,4	0,7	23,8	10	0,95	
RNA-Vorsäule [%]	0,029	0,014	0,018	0,19	0,1	0,018	0,027	0,027	

Ergebnisse

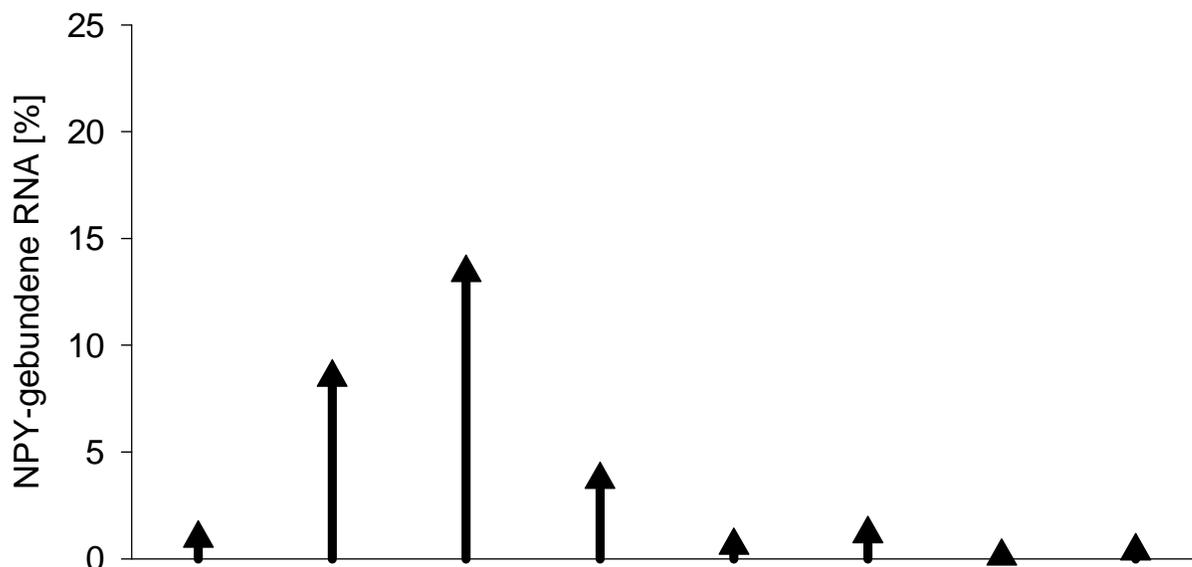
Abbildung 11 *Der Verlauf der NPY-Selektion bis zum sechsten Selektionszyklus. Dabei ist der relative Anteil an gebundener RNA in [%] für die einzelnen Selektionszyklen aufgetragen (Abszisse). Die detaillierten Selektions- und Präselektionsbedingungen sowie die Ergebnisse der Selektion und Präselektion sind in der abgebildeten **Tabelle 5** zusammengefaßt (SV=Säulenvolumen).*

Nach sechs Selektionszyklen zeigte sich eine deutliche Anreicherung von 24% an NPY-bindenden RNA-Molekülen (Abb. 11, 6; Abb. 12, 6a). Mit dem Ziel, in diesem Selektionszyklus möglichst affine Aptamere zu selektieren, wurde in zwei Parallelansätzen mit der in Zyklus 5 generierten RNA-Bibliothek der Selektionszyklus 6a unter stringenteren Bedingungen wiederholt:

Reduzierte man die eingesetzte Peptidkonzentration auf 5 μM , erniedrigte sich der prozentuale Anteil an gebundener RNA auf 10% (Parallelansatz 6b). Unter noch stringenteren Bedingungen mit einer Ionenstärke von 300 mM NaCl im Inkubationsansatz, einem erhöhten Waschvolumen von 100 auf 650 Säulenvolumen sowie einem Waschpuffer versetzt mit 300 bis 750 mM NaCl und 1% Triton X-100 (Abb. 12 6c) zeigte sich eine drastische Reduktion der NPY-RNA-Liganden auf 0,95% (Parallelansatz 6c). Diese sehr affinen Binder wurden eluiert und im 7. Selektionszyklus weiter verwendet.

In den folgenden Selektionsrunden (Zyklus 7-12) wurde der Selektionsdruck mit dem Hintergrund, möglichst spezifische NPY-Aptamere zu selektieren, sukzessiv erhöht. Man setzte beispielsweise den unspezifischen Kompetitor Heparin, ein negativ geladenes Glukosaminoglykan, dem Bindungsansatz ab Zyklus 7 hinzu (final 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), die Waschvolumina wurden erhöht und dem Waschpuffer sowohl NaCl (300mM, 500mM und 750mM) als auch Triton X100 (1%) zugesetzt. Des weiteren wurde die NPY-Konzentration schrittweise bis auf 2,5 μM (Zyklus 9 bis 12) erniedrigt. Der weitere Selektionsverlauf (6c-12) sowie die detaillierten Selektionsbedingungen sind in Abb. 12 und Tab. 6 dargestellt. Analog zu Zyklus 6 wurde der 8. Selektionszyklus mit zwei Parallelansätzen durchgeführt. Der neunte Selektionszyklus wurde mit der in Zyklus 8b generierten RNA-Bibliothek fortgeführt. Bedingt durch die stringenteren Selektionsbedingungen reduzierte sich der Anteil NPY-bindender RNA-Moleküle von ca. 8% im 7. Zyklus auf unter 2% in Zyklus 9 bis 12.

Ergebnisse



Selektionszyklus	6c	7	8a	8b	9	10	11	12
RNA-Konz.	3,3 μ M	→						
NPY-Konz.	5 μ M	5 μ M	2,5 μ M	→				
Präselektionsmaterial	Strept.-agarose	Peptid III, 10 μ M	Peptid I, 10 μ M, Peptid III, 5 μ M	Peptid I, 10 μ M, Peptid III, 5 μ M	Peptid I, 10 μ M, Peptid III, 10 μ M			
Inkubationsbedingungen	300 mM NaCl in 1 \times PBS	1 μ g/ μ l Heparin in 1 \times PBS			10% FKS, Inhibitoren in 1 \times PBS	→		
Waschbedingungen	650 SV 1 \times PBS (+300, 750 mM NaCl, 1% Triton)	1333 SV 1 \times PBS (+750 mM NaCl, 1% Triton)	100 SV 1 \times PBS (+ 1% Heparin)	880 SV 1 \times PBS (+750 mM NaCl, 1% Triton, 3% Heparin)	100 SV 1 \times PBS	→		
RNA-NPY [%]	0,95	8,5	13,4	3,7	0,62	1,17	0,114	0,35
Vorsäule [%]	0,027	0,012	0,013	0,013	0,016			

Ergebnisse

Abbildung 12 Verlauf der NPY-Selektion ab Selektionszyklus 6c. Der relative Anteil an spezifisch gebundener RNA in [%] ist für die einzelnen Selektionszyklen aufgetragen (Abszisse). Die von Zyklus zu Zyklus variierten Selektionsbedingungen und Präselektionsbedingungen sowie die Ergebnisse der Selektion und Präselektion sind in der **Tabelle 6** zusammengefaßt. Ausgangsmaterial für die weitere Selektion ab Zyklus neun war die in Zyklus 8b eluierte RNA-Bibliothek. Die Aminosäuresequenzen der Peptide I und III sind im Materialteil angegeben. Als Proteaseinhibitoren (Inhibitoren) in Zyklus 9-12 wurden Aprotinin (0,2 µg/µ), Leupeptin (0,2 µg/µ) und Pefabloc (0,5 mM) verwendet (SV=Säulenvolumen, FKS=fötales Kälberserum).

Um eine Bindung der selektierten RNA-Moleküle an nicht immobilisiert vorliegendem NPY zu gewährleisten, wurde in den letzten vier Zyklen das Zielpeptid mit dem angereicherten Pool für 1 Stunde bei 37°C in Lösung inkubiert und erst anschließend an Streptavidinagarose für 15 min bei 37°C immobilisiert. Durch die Verwendung von derivatisiertem Vorsäulenmaterial (Zyklus 7 bis 9), immobilisiert mit synthetischen Peptiden, welche durch unterschiedliche isoelektrische Punkte von pI 6,1 (Peptid I) und einen pI 10 (Peptid III) charakterisiert sind (vgl. Material), sollten aufgrund unspezifischer Peptid-Wechselwirkungen bindende RNA-Sequenzen eliminiert werden. Da im Falle des Vorsäulenmaterials kein erhöhter Anteil an gebundenen Nukleinsäuren bis zum neunten Zyklus detektierbar war (Abb. 12, Tab. 6), wurde in den letzten drei Runden auf eine Präselektion verzichtet.

Um die Stringenz der Selektion noch weiter zu verstärken und die *in vitro* Bedingungen den Bedingungen "*in vivo*" möglichst anzunähern, wurde die neunte bis zwölfte Selektionsrunde in Gegenwart von 10% FKS durchgeführt. Damit hat sich der Anteil an NPY bindenden RNA-Liganden weiter erniedrigt. Wie in einem Vorexperiment gezeigt wurde, sind für NPY in Gegenwart von 10% FKS sowie den Proteaseinhibitoren Aprotinin, Pefabloc und Leupeptin über mehr als 2 Stunden keine Degradationserscheinungen detektierbar. Eine erneute Anreicherung unter FKS-Bedingungen konnte in den folgenden Selektionszyklen nicht erzielt werden. Die Selektion wurde nach dem 12. Zyklus beendet

Ergebnisse

4.2.2 Die Bindung des selektierten Pools an NPY

Vor der Klonierung und Sequenzierung der selektierten Liganden wurde das Bindungsverhalten der angereicherten RNA-Bibliothek aus Zyklus 12 und der unselektierten Pool-RNA in Gegenwart von NPY untersucht. Die einzelnen Bindungsreaktionen setzten sich aus unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (50 nM-7 μ M) und einer konstanten RNA-Konzentration (1 nM), welche am 5'-Ende kinasiert war, zusammen. Die Ansätze wurden über Nitrozelluloseacetat-Membranen filtriert und die zurückgehaltenen RNA-Peptidkomplexe anhand der Radioaktivität quantifiziert (vgl. 3.5.1).

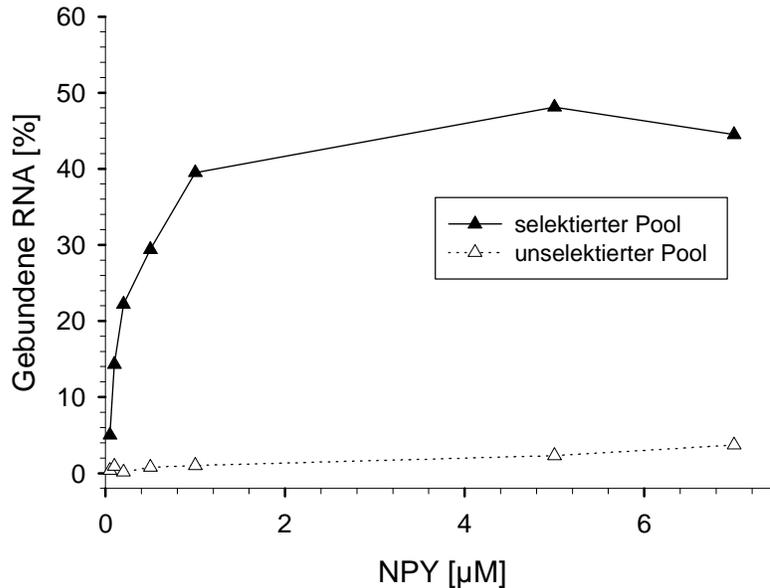


Abbildung 13 Bindungsstudie der selektierten RNA-Bibliothek an NPY nach Zyklus 12 (gefülltes Dreieck) im Vergleich zur unselektierten Pool RNA (ungefülltes Dreieck). Der relative Anteil an komplexierter RNA [%] ist in Abhängigkeit von der eingesetzten NPY-Konzentration [μ M] dargestellt.

Aus den erstellten Bindungskurven wird deutlich (Abb. 13), daß die angereicherte RNA-Bibliothek aus Zyklus 12 eine wesentlich höhere Affinität zum NPY zeigt als der unselektierte Pool. Während der Kurvenverlauf der selektierten Bibliothek bei einer NPY-Konzentration von 5 μ M einen Sättigungsbereich aufweist, konnte für den unselektierten Pool keine signifikante Retention auf der Nitrozellulosemembran

Ergebnisse

detektiert werden. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die unselektierte Pool-RNA war aus diesem Grund nicht möglich. Für die selektierte Pool-RNA wurde eine Dissoziationskonstante von ca. 500 nM berechnet.

4.2.3 Klonierung und Sequenzierung des selektierten Pools

Nach erfolgter Selektion befinden sich im angereicherten Pool verschiedene RNA-Moleküle, die unterschiedliche Bindungseigenschaften für das Targetpeptid NPY aufweisen. Um diese individuellen Sequenzen identifizieren und charakterisieren zu können, wurde die RNA-Bibliothek nach dem 12. Zyklus kloniert. Durch reverse Transkription der eluierten RNA und anschließender PCR-Amplifikation der erhaltenen cDNA konnten durch die Primer PM39-5' und PM-25-3' die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. Nach dem Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit Hind III und Bam HI wurde die ds DNA in den analog behandelten Vektor pGEM-4Z ligiert (vgl. Abb. 7). Die Ligationsprodukte wurden in *E.coli* transformiert, vermehrt und die Plasmid-DNA für die Sequenzierung aus einzelnen *E.coli* Klonen isoliert (vgl. 3.1.5, 3.1.6).

Die Sequenzierung von 30 Klonen (Sanger, *et al.*, 1977) (vgl. 3.3.15) ergab Sequenzen, die sich aufgrund ihrer fast identischen Primärstruktur in zwei Familien (I, II) unterteilen ließen. Darüberhinaus befanden sich unter den sequenzierten Klonen Kandidaten, die keine Homologien zu den Sequenzfamilien bzw. zueinander aufweisen. Man bezeichnet diese nur einmal vorkommenden Sequenzen allgemein als Orphans (Abb. 14).

Ergebnisse

Familie I

Klon	Sequenz
DP11 (11)	CAAGGCCGGGTTAGGTGGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG
DP1	CAAGGCCGGGTTAGG C GGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG
DP27	CAAGGCCGGGT G AGGTGGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG
DP12 (2)	CAAGGCCGGGTTAGGTGGGACCGTGATCTGATGTG A CGTG
DP28 (2)	CAAGGCCGGGTTAGG G GGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG
DP2	CAAGGCCGGGTTAGGTGGGACCGTGAT A CTGATGTGG G GAG
DP5 (2)	CAAGGCCGGGTTAGG-GGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG
DP20	CAAGGCCGGGTTAGG-GGGACCGTGATCTG T AGTGGCGTG
DP26 (2)	CAAGGCCGGGTTAGGTGGGAC-GTGATCTGATGTGGCGTG
DP22	CAAGGCCGGGTTAGGTGGGACTGTGAT T TCGATGTGGCTG
DP4	CAAGG---GGTTAGG-GGGACCGTGATCTGATGTGGCGTG

Familie II

DP3	CAGCAGGAGGGCCGGCGTTAGGGTTAGCGAGCCGATTGAA
DP8	CAGCAGGAGGGCCGGCGTTAGGGTTAGCGAGCCGAT-GAA

orphans

DP14	CTGCCAAAGGTTGGCCATGTGTGGGGGAAGCTCCAACGT-
DP19	GCCACCAATGCGCACCCACCCAGACACGTCAAGTCAAGT-
DP25	GGATACTTAGCGTAAGTNAGTGGCTGGGGGGTGACGAAG-

Abbildung 14

Ermittelte Sequenzen aus dem angereicherten Pool der NPY-Selektion. Für jeden Klon ist nur die ursprünglich randomisierte Region 40N gezeigt, ohne die konstanten Primerbindungsstellen. Die Anzahl identischer Sequenzen ist in den Klammern angegeben. Die 2'-Amino-2'-deoxycytidin and 2'-Amino-deoxyuridine Reste sind als C oder T bezeichnet. N zeigt einen nicht eindeutig bestimmbar Nukleotidrest. Mutationen und Deletionen (-) innerhalb einer Familie sind fettgedruckt, wobei diese sich immer auf die erste dargestellte Sequenz beziehen.

Die Sequenzierung ergab, daß die Diversität des Pools nach 12 Selektionsrunden am NPY stark minimiert wurde. Die Mehrheit (ca. 80%) aller selektierten Klone gehören zur Sequenzfamilie I. Die Mitglieder dieser hoch konservierten Familie unterscheiden sich nur durch Punktmutationen und Deletionen. Die am häufigsten

Ergebnisse

vorkommende Sequenz aus der Familie I ist der Klon DP11. Die zweite Sequenzfamilie besteht nur aus zwei Sequenzen, die sich in einer Position unterscheiden (vgl. Abb. 14).

4.2.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten individueller Sequenzen an NPY durch Nitrozellulosefilterbindungsstudien

Um die Affinität repräsentativer Sequenzen an NPY zu bestimmen, wurden Nitrozellulosefilterbindungsstudien durchgeführt. Das Targetpeptid NPY wurde in steigenden Konzentrationen mit den individuellen, radioaktiv markierten RNA Sequenzen inkubiert. Über Nitrozellulosefiltration wurde gebundene von nicht gebundener RNA separiert und die auf den Filtermembranen verbleibende Radioaktivität quantifiziert (vgl. 3.5.1). Durch Zusatz von 20 µg Streptavidin pro Ansatz sollte die Retention der kurzen Peptide auf den Filtern verbessert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß alle getesteten Sequenzen außer DP14 und DP19 (*orphans*) das in Lösung vorliegende, freie Peptid komplexieren können, obwohl in den ersten Selektionszyklen Aptamere gegen das immobilisierte NPY generiert wurden. In Abb. 15 ist der Anteil an NPY-gebundener RNA, welche auf dem Filter zurückgehalten wurde, in Abhängigkeit von der NPY-Konzentration dargestellt. Aus den Kinetiken der einzelnen Sequenzen konnten die Dissoziationskonstanten (K_d), welche eine monophasige Reaktion beschreiben (vgl. Gl.1), ermittelt werden. Für die am häufigsten vorkommende Sequenz DP11 und für den ebenfalls zur Familie I gehörenden Klon DP4 wurden K_d-Werte von 470 nM bzw. 410 nM berechnet. Der Ligand DP3 aus der Familie II zeigt mit einer Dissoziationskonstante von 370 nM die höchste NPY-Affinität. Aus diesem Grund wurde DP3 für weitere Untersuchungen herangezogen. Für DP25 wurde ein K_d-Wert von 25 µM ermittelt, eine fast 70 mal niedrigere Affinität für NPY verglichen zu DP3. Die Dissoziationskonstanten für die Sequenzen DP14 und DP19 konnten nicht bestimmt werden, da nur 10% der eingesetzten RNA bei einer Konzentration von 7 µM NPY auf dem Filter zurückgehalten wurden. Die unselektierte Pool RNA zeigt bei einer NPY-Konzentration von 7 µM eine geringe Bindung von 4%, die nicht im Sinne einer monophasigen Reaktion quantifiziert werden kann.

Ergebnisse

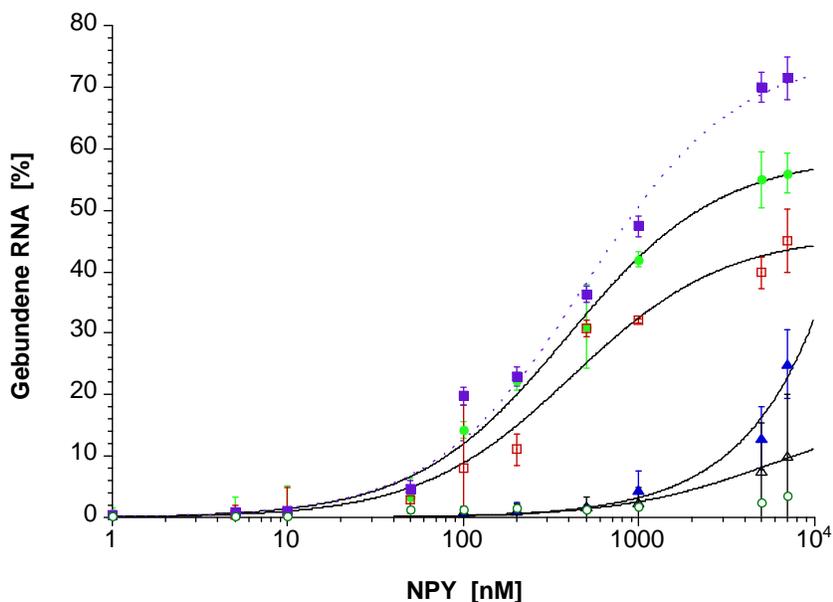


Abbildung 15 Bindungskurven repräsentativer Aptamersequenzen an NPY. Familie I DP4 (offenes Quadrat) und 11 (gefülltes Quadrat), Familie II DP3 3 (gefüllter Kreis), orphan 25 (gefülltes Dreieck), orphan 19 (offenes Dreieck), pool (offener Kreis). Die Fraktion der gebundenen ^{32}P -markierten RNA ist dargestellt als Funktion der eingesetzten NPY-Konzentration. Die Linien repräsentieren den Fit der einzelnen Datenpunkte für jedes Aptamer entsprechend einer monophasigen Bindungsreaktion (vgl. 3.5.1). In jeden Kurvenverlauf gehen die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen (Standardabweichung) ein.

4.2.5 Spezifität von DP3 innerhalb der Pankreatischen Polypeptidfamilie

In einem Vorexperiment konnte mittels *in vitro* Filterretentionsassay gezeigt werden, daß sowohl Aptamer DP3 als auch DP11 das vollständig randomisierte NPY nicht binden. Um die Spezifität von DP3 innerhalb der Pankreatischen Polypeptidfamilie zu untersuchen, wurde dessen Bindungsfähigkeit gegenüber dem pankreatischen Polypeptid (PP), welches neben dem Neuropeptid Y (NPY) und dem Peptid YY (PYY) Mitglied der pankreatischen Polypeptidfamilie ist, im Nitrozellulosefilterassay getestet. Gemeinsames Merkmal der strukturverwandten, tyrosinreichen Peptide ist eine Sequenz von 36 Aminosäuren mit einem C-terminalem Tyrosinamid (vgl. Einleitung). Das hPP wurde bei einer Konzentration von 10 μM von DP3 nicht gebunden, obwohl

Ergebnisse

NPY und hPP zu 50% sequenzhomolog sind (vgl. Abb. 16). Bei einem weiteren Experiment wurde das hPP über seinen N-terminalen Biotinrest an Streptavidinagarose immobilisiert (30 μ M) und mit radioaktiv markierter RNA unter Selektionsbedingungen (entsprechend Zyklus 5) inkubiert. Auch hier konnte keine Interaktion zwischen DP3 und dem hPP detektiert werden.

A

NPY	Y PSKPDNPGED APA ED MARYYSALRHYINLI TRQRY -CONH ₂
hPP	AP LEPVYPGD NAT PEQMAQYAAD LRRYINML TRPRY -CONH ₂
rNPY	SKPQRDANREPTRYAIYDYSNPDIELHYLRPAYALG-CONH ₂

B

<i>Aptamer</i>	<i>NPY</i>	<i>Random-NPY</i>	<i>hPP</i>
DP3	370	n.d.	n.d.
DP4	410		
DP11	470	n.d.	
DP14	n.d.		
DP19	n.d.		
DP25	25000		
Pool	n.d.	n.d.	n.d.

Abbildung 16

A) Sequenzen der synthetischen Peptide Neuropeptid Y (NPY), random-NPY (rNPY) und dem humanen pankreatischen Polypeptid (hPP): homologe Aminosäurereste von NPY und hPP sind fett hervorgehoben, CONH₂ repräsentiert die carboxyterminale Amidierung.

B) Ermittelte Dissoziationskonstanten (nM) der in vitro selektierten Aptamere, n.d. = nicht detektierbar.

Ergebnisse

4.2.6 Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Aptamers DP3 an NPY durch analytische Affinitätschromatographie

Mit 370 nM zeigte das Aptamer DP3 die beste Affinität zum NPY im Filterretentionsassay, verglichen mit den anderen untersuchten Sequenzen. Da eine unvollständige Retention der Peptidkomplexe die K_d-Werte beeinflussen kann, sollte die Dissoziationskonstante von DP3 durch analytische Affinitätschromatographie verifiziert werden. Der Versuchsablauf für die affinitätschromatographische Bestimmung der Dissoziationskonstanten an NPY ist im Kapitel 3.5.5 detailliert beschrieben. Dabei wurde ein kleines Volumen an radioaktiv markierter RNA auf die NPY-derivatisierte Säule aufgetragen und fraktionsweise mit Bindungspuffer gewaschen. Hierbei gilt: Je kleiner die Dissoziationskonstante der Aptamere ist, desto später werden die Nukleinsäureliganden eluieren. Die erste nicht bindende RNA-Fraktion wird verworfen und die folgenden RNA-Fraktionen werden quantifiziert und additiv aufgetragen (Abb. 17). Da ein Sättigungsbereich erzielt wird, war es möglich, das Elutionsvolumen, bei dem die Hälfte des an die Affinitätsmatrix gebundenen Liganden wieder von der Säule eluiert ist, zu bestimmen. Die in Doppelbestimmungen ermittelten Elutionsvolumina sowie die Konzentration des immobilisierten Peptides waren Grundlage zur Berechnung der Dissoziationskonstanten. Für DP3 resultiert ein K_d-Wert von 300 nM (vgl. 3.5.5, Gl. 2). Dieser K_d-Wert ist vergleichbar mit dem K_d-Wert, welcher durch das Filterretentionsexperiment (370 nM) für DP 3 ermittelt wurde. Aufgrund dieses Ergebnisses kann zum einen davon ausgegangen werden, daß die Retention der RNA-Peptid-Komplexe auf den Nitrozellulosefiltern quantitativ war, und zum anderen, daß das Bindungsverhalten von DP3 an den immobilisierten Liganden im Vergleich zum Liganden in Lösung nahezu identisch ist. Keine Interaktion konnte mit der unselektierten RNA-Bibliothek (Mic Mod 40N) und dem NPY-derivatisierten Säulenmaterial detektiert werden.

Ergebnisse

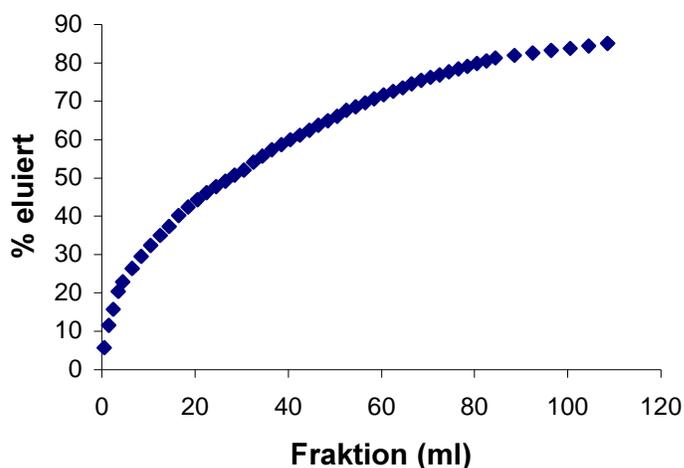


Abbildung 17 Desorptionsprofil (Doppelbestimmung) des Aptamers DP3 in Gegenwart von NPY (immobilisiert an Streptavidinagarose). Die Elutionsfraktionen (ml) von DP3 (x-Achse) wurden addiert und prozentual in Relation zur total eingesetzten RNA-Menge (y-Achse) aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels PBS, pH 7,4.

4.2.7 Stabilität der 2'-Amino-2'-deoxy Nukleinsäueren

Da die biologische Aktivität des Aptamers DP3 in Wettbewerbsstudien im Zellkulturmodell untersucht werden sollte, war in einem Vorexperiment die Stabilität von DP3 in MEM-Medium, welches 10% fötales Kälberserum (FKS) enthält, zu untersuchen. Die radioaktiv markierte RNA wurde bei 37°C mit dem Medium für 48 Stunden inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 18 sind die Autoradiogramme für 2'-Amino-2'-deoxy DP3 (A) und für 2' Hydroxy DP3 RNA (B) dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die Stabilität des 2'-Amino-2'-deoxy modifizierten RNA-Aptamers DP3 in 10% FKS im Vergleich zur unmodifizierten RNA mit der gleichen Primärsequenz wesentlich erhöht ist. Abbildung 18 A zeigt, daß für die 2'-Amino-2'-deoxy DP3 RNA innerhalb von 12 Stunden keine Degradation detektiert werden kann. Erst nach 48 Stunden kann bei einem Teil der 2'-Amino-2'-deoxy DP3 RNA Degradation nachgewiesen werden. Dagegen zeigen die unmodifizierten DP3-RNA -Moleküle eine sehr geringe Stabilität in 10%igem FKS (Abb. 18 B). Nach 5 min sind sie vollständig in kürzere Fragmente

Ergebnisse

abgebaut, nach 10 min sind nur noch die radioaktiv markierten Nukleotide auf der untersten Lauffront des Gels zu erkennen. Der unselektierte Pool MicMod40N weist ausreichende Stabilität für die Zellkulturexperimente auf, in denen Zellen über 90 min mit der RNA inkubiert werden (Blind, 2000). Diese Beobachtungen liegen in guter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen 2'-modifizierter RNA-Bibliotheken in biologischen Medien (Lin, *et al.*, 1994).

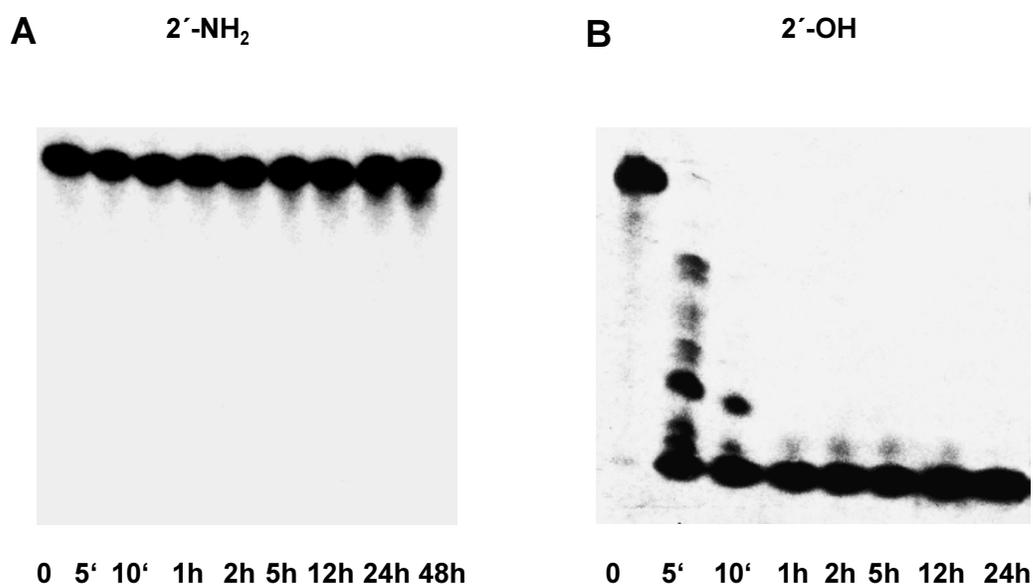


Abbildung 18 Stabilität von 2'-Amino-2'-deoxy-pyrimidin (2'NH₂) DP3-RNA (**A**) und unmodifizierter 2' Hydroxy (2'OH) DP3-RNA (**B**) in fötalem Kälberserum. 60 pmol 2'NH₂ bzw. 2'OH RNA wurden jeweils in 200 µl MEM Puffer versetzt mit 10% FKS bei 37°C für 24 bzw. 48 h Stunden inkubiert. Ein 20 µl Aliquot wurde von jedem Reaktionsansatz nach den entsprechenden Zeiten entnommen und auf einem 15%igem PAA-Gel aufgetragen (vgl. 3.2.3).

4.2.8 Die Identifizierung der minimalen Aptamer-Bindungsstelle an NPY

Um die Bindungsregion von DP3 am NPY genauer definieren zu können, wurden verschiedene biotinylierte NPY-Fragmente (7 µM) mit dem radioaktiv markierten RNA-Liganden DP3 (50 pmol) inkubiert. Die biotinylierten Peptide lagen dabei im

Ergebnisse

immobilisiertem Zustand vor, um Präzipitationsprobleme, wie sie mit einigen Peptidfragmenten in Vorexperimenten in Lösung auftraten, zu vermeiden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl der N-Terminus von NPY (AS 1-10) als auch der zentrale Aminosäureabschnitt (AS 5-24) nicht für die Wechselwirkung mit dem Aptamer notwendig sind (Abb. 19 Nr. 1 bis 8). Dagegen wurden für die C-terminalen NPY-Varianten folgende Dissoziationskonstanten für DP3 in einer Filterbindungsstudie ermittelt: NPY 18-36: 1160 nM, NPY [Ahx⁵⁻²⁴]: 710 nM und NPY 13-36: 760 nM, was einer ca. 2-3-fach schlechter Affinität im Vergleich zum gesamten NPY entspricht (Abb. 19 Nr. 8 bis 10). Demzufolge repräsentiert der C-Terminus den Interaktionsbereich zwischen NPY und DP3.

Um zu untersuchen, inwieweit die basischen Argininseitenketten die elektrostatische Interaktion zwischen dem negativ geladenen RNA-Molekül und dem positiv geladenem Peptidmotiv beeinflussen, wurden vier Arginine im C-terminalen Bereich durch Alaninreste substituiert. Es zeigte sich, daß Arginin an Position 33 essentiell für die Interaktion mit dem Aptamer ist. Dagegen beeinflusst ein Austausch des Arginins an Position 19 zum Alanin die Interaktion mit der RNA nicht. Die Bindung an das NPY-Derivat mit einer Argininsubstitution durch Alanin an Stelle 25 ist um 50% reduziert. Der Argininrest 35 spielt eher eine untergeordnete Rolle bei der Aptamer-NPY-Komplexbildung: Trotz Substitution durch das ungeladene Alanin werden in einem Bindungsexperiment immer noch ca. 3/4 der eingesetzten RNA gebunden (vgl. Abb. 19).

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu: Der C-terminale NPY-Bereich repräsentiert das Epitop, welches von DP3 gebunden wird, wobei DP3 eine hohe Spezifität bzgl. eines Aminosäurerestes, des Arginins 33, aufweist. Eine Punktmutation an dieser Stelle (R33A) führt zu einem vollständigen Verlust der Peptiderkennung.

Aus den Untersuchungen geht weiterhin hervor, daß die stärker verkürzten C-terminalen Fragmente NPY 18-32, NPY 18-34, NPY 18-28, NPY 25-34, NPY 25-36 (Abb. 19, Nr. 3 bis 7), welche die postulierte Interaktionsdomäne widerspiegeln, als trunkierte NPY-Konstrukte keine bzw. eine nur sehr schwache Wechselwirkung mit DP3 aufweisen.

Ergebnisse

NPY/ NPY-Analoge	Sequenz	Bindung
NPY	Biotin-YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLIT R QRY-CONH ₂	++
1. NPY 1-10	Biotin-YPSKPDNPGE-CONH ₂	-
2. NPY 5-20	Biotin- PDNPGEDAPAEDLARY-CONH ₂	-
3. NPY25-34	Biotin- RHYINLIT R Q-CONH ₂	-
4. NPY25-36	Biotin- RHYINLIT R QRY-CONH ₂	-
5. NPY18-28	Biotin- ARYYSALRHYI-CONH ₂	-
6. NPY18-32	Biotin- ARYYSALRHYINLIT-CONH ₂	-
7. NPY18-34	Biotin- ARYYSALRHYINLIT R Q-CONH ₂	-
8. NPY [Ahx ⁵⁻²⁴]	Biotin-YPSK [5-24] RHYINLIT R QRY-CONH ₂	++
9. NPY13-36	Biotin- PAEDLARYYSALRHYINLIT R QRY-CONH ₂	++
10. NPY18-36	Biotin- ARYYSALRHYINLIT R QRY-CONH ₂	++
11. NPY18-36[A ¹⁹]	Biotin- A ARYYSALRHYINLIT R QRY-CONH ₂	++
12. NPY18-36[A ²⁵]	Biotin- ARYYSAL A HRYINLIT R QRY-CONH ₂	+
13. NPY18-36[A ³³]	Biotin- ARYYSALRHYINLIT A QRY-CONH ₂	-
14. NPY18-36[A ³⁵]	Biotin- ARYYSALRHYINLIT R Q A Y-CONH ₂	+
15. NPY[L ³¹ , P ³⁴]	Biotin-YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLL T RP R Y-CONH ₂	-
16. NPY[A ³¹ , Aib ³²]	Biotin-YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINL A A ib RQRY-CONH ₂	+

Abbildung 19 Bindung des NPY-Aptamers (DP3) an verschiedene, immobilisierte NPY-Varianten.

1 bis 7, 9, 10: NPY-Varianten mit verschiedenen N- und C-terminalen Aminosäuredeletionen

11 bis 14 Substitutionen der Aminosäure Arginin durch Alanin an unterschiedlichen Positionen im C-terminalen Bereich, Aminosäuremutationen sind in eckigen Klammern angegeben und in der Peptidsequenz fett hervorgehoben.

8: Y2-Rezeptoragonist, charakterisiert durch die Substitution der zentralen Aminosäuren 5-24 durch einen Aminohexansäurelinker

15: Y1-Rezeptoragonist,

16 Y5-Rezeptoragonist, Aib = Aminoisobuttersäure

Die aminoterminalen Biotinylierung und die carboxyterminale Amidierung sind durch Biotin- bzw. -CONH₂ gekennzeichnet.

Die relativen Bindungsaffinitäten der verschiedenen Peptidvarianten sind im Vergleich zum

Ergebnisse

NPY in drei Klassen unterteilt: - 0-10% Bindung im Vergleich zur NPY Kontrolle, + 11-80% Bindung im Vergleich zur NPY Kontrolle, ++ 81-100% Bindung im Vergleich zur NPY Kontrolle. Der Aminosäurerest (R33), welcher essentiell für die Wechselwirkung mit dem Aptamer DP3 ist, ist hervorgehoben.

4.2.9 Die Interaktion von Aptamer DP3 mit spezifischen NPY-Rezeptor Agonisten

Eine Methode zur Charakterisierung der NPY-Rezeptorsubtyp-Interaktion war die Entwicklung von spezifischen Rezeptorsubtypagonisten (vgl. Einleitung, Tab. 2). In Analogie dazu sollte das Bindungsverhalten des Aptamers DP3 an verschiedenen NPY-Agonisten untersucht werden.

Die Substitution von Gln 34 nach Prolin erzeugt einen hoch selektiven Y1-Rezeptor Agonisten (Fuhlendorff *et al.*, 1990), welcher vom Y2-Rezeptor nicht mehr gebunden wird. Cabrele *et al.* konnten zeigen, daß das Dipeptid Ala31-Aib32 eine Konformation begünstigt, die vom Y5-Rezeptor präferentiell gebunden wird (Cabrele, *et al.*, 2000). Beide Modifikationen beeinflussen die Interaktion mit DP3. Während an der NPY-Mutante Pro 34 (Y1-Rezeptor Agonist) (vgl. Abb. 19, Nr. 15) keine Bindung detektiert werden konnte, ist die Wechselwirkung mit der Ala31 Aib32 NPY-Mutation um ca. 50% reduziert verglichen zur Interaktion von DP3 und NPY (vgl. Abb. 19, Nr. 16). Im Gegensatz dazu weist DP3 eine hohe Affinität zum zentral verkürzten Y2-Rezeptor Agonisten NPY [Ahx⁵⁻²⁴] (vgl. Abb. 19, Nr. 8) auf (Beck *et al.*, 1989). Auch die N-terminal verkürzten NPY-Varianten (vgl. Abb. 19, Nr. 9 und 10), die nur vom Y2-Rezeptor gebunden werden, nicht aber vom Y1- oder Y5-Rezeptor, werden von DP3 annähernd so gut gebunden wie das gesamte NPY. Aptamer DP3 zeigt, soweit aus den bisherigen Ergebnissen ersichtlich, ein ähnliches Bindungsverhalten an NPY wie der Y2-Rezeptor. Diese Hinweise werden im folgenden durch Rezeptorkompetitionsstudien weiter untersucht.

4.2.10 Die selektive Inhibition der NPY/NPY-Rezeptorinteraktion durch DP3

Die Inhibition der Bindung von NPY an individuelle Rezeptorsubtypen durch DP3 wurde an Neuroblastomzelllinien, die entweder den hY1 Rezeptor (SK-NM-C Zellen) oder den hY2-Rezeptor (SMS-KAN-Zellen) endogen exprimieren, untersucht. Für

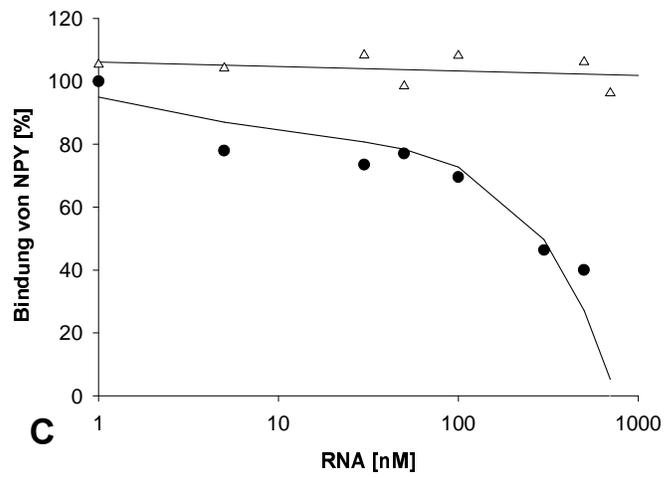
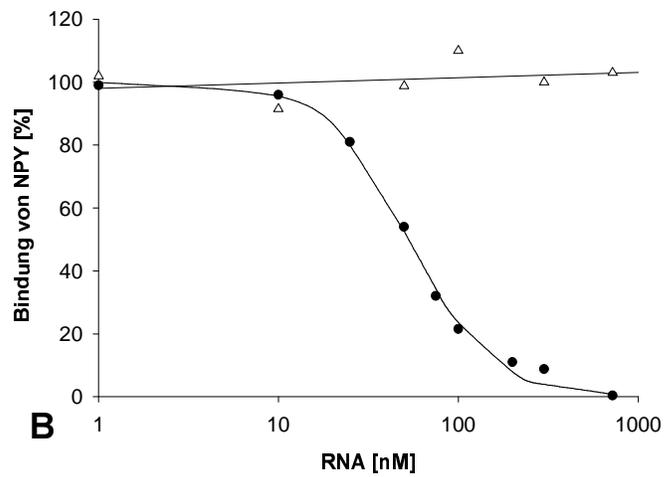
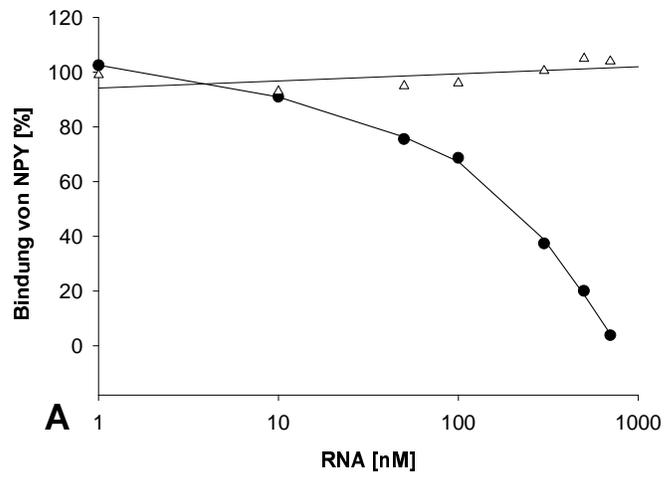
Ergebnisse

die Konkurrenz am Y5-Rezeptor nutzte man BHK-Zellen, die stabil mit dem Y5-Rezeptor (rY5) transfiziert waren (vgl. 3.6.2). Klon DP 3 zeigte in den *in vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten die höchste Affinität innerhalb der analysierten Sequenzen und wurde deshalb für die Zellkulturstudien herangezogen. Die unselektierte Pool-RNA, welche keine *in vitro* Affinität zum NPY aufweist, wurde als Kontrollansatz verwendet.

In Abb. 20 sind die Ergebnisse der Konkurrenzstudien zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß mit steigender Konzentration an DP3 die spezifische Bindung von NPY an den untersuchten Rezeptorsubtypen zunehmend inhibiert wird. Dieser Effekt ist in Gegenwart des unselektierten RNA-Pools nicht zu beobachten. Dabei unterscheidet sich der Verlauf der Konkurrenzkurven am Y1- und Y5-Rezeptor deutlich von dem der Konkurrenzkurve am Y2-Rezeptor: Die Konkurrenz zwischen DP3 und dem Y2-Rezeptor um das NPY kann durch eine monophasische Kinetik beschrieben werden. Die dabei ermittelten IC_{50} -Werte geben an, bei welcher Konzentration von DP3 eine halbmaximale Inhibition der Bindung von NPY an einen Rezeptorsubtyp erzielt wird. Dabei wurde für die Konkurrenz der Bindung von NPY an den Y2-Rezeptor ein IC_{50} -Wert von 73 ± 25 nM berechnet. Im Gegensatz dazu sind die Konkurrenzkurven am Y5- und Y1-Rezeptor durch einen flachen, biphasischen Verlauf charakterisiert. Die ermittelten IC_{50} -Werte für Y1 und Y5 liegen mit $328 \text{ nM} \pm 141$ (Y1) und $416 \text{ nM} \pm 63$ nM (Y5) deutlich über den IC_{50} -Wert für DP3 am Y2-Rezeptor. Aus den Konkurrenzkurven (Abb. 20, A und C) wird weiter deutlich, daß bei einer DP3-Konzentration von 1-10 nM etwa 10-20% der Bindung von NPY an den Y1 bzw. Y5-Rezeptor inhibiert wird. Eine vollständige Konkurrenz der Komplexbildung von NPY und den Rezeptorsubtypen (Y1, Y5) wird erst bei einer DP3 Konzentration von 1000 nM erzielt.

Aus den berechneten IC_{50} -Werten konnten unter Einbeziehung des K_d -Wertes für NPY an den jeweiligen Rezeptorsubtyp (vgl. Tab. 7) die entsprechenden K_i -Werte berechnet werden. Demzufolge zeigt sich mit einem K_i -Wert von 1,3 nM eine etwa 40-200-fach höhere DP3 abhängige Inhibition der NPY/Y2-Rezeptorinteraktion als die Inhibition der NPY-Bindung an den Y1- und den Y5-Rezeptor, obwohl der Y2-Rezeptor die höchste Affinität zum NPY aufweist.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 20 *Kompetition der spezifischen Bindung von $^3\text{H-NPY}$ an G-Protein-gekoppelte transmembrane Rezeptorsubtypen Y1 (A), Y2 (B), Y5 (C) in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration (Aptamer-RNA (gefüllter Kreis), unselektierte Pool-RNA (ungefülltes Dreieck)).*

Die einzelnen Werte sind gemittelt aus vier Experimentreihen, wobei jeder Datenpunkt in einem Triplettansatz bestimmt wurde.

Rezeptor	IC ₅₀ (nM)	Kd (nM)	K _i (nM)
Y1	328±141	0,18	50±21
Y2	73±25	0,02	1,3±0,5
Y5	416±63	1,7	262±40

Tabelle 7 *Die IC₅₀-Werte für die Rezeptoren wurden aus den Kompetitionstudien von DP3 im Zellkultursystem ermittelt. Die einzelnen Kd-Werte für die NPY-Bindung an die Rezeptorsubtypen Y1, Y2 bzw. Y5 sind der Literatur entnommen (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000). Die K_i-Werte für DP3 wurden mittels folgender Gleichung 3 berechnet: $K_i = IC_{50} [(1+L)Kd^{-1}]^{-1}$, wobei L die Konzentration des eingesetzten $^3\text{H NPY}$ ist (für Y1 und Y5 [1 nM], für Y2 [2 nM]).*

Ergebnisse

4.3 Charakterisierung von Prionprotein spezifischen Aptameren

Die zwei Isoformen des Prionproteins, das zelluläre Prionprotein (PrP^{C}) und das pathogene Prionprotein (PrP^{Sc}), zeigen trotz identischer Primärstruktur Unterschiede hinsichtlich biochemischer und biophysikalischer Eigenschaften (vgl. Einleitung, Tab. 3). Die Konversion von der zellulären in die pathogene PrP-Isoform ist charakterisiert durch eine konformationelle Veränderung von einer hauptsächlich α -helikalen Struktur (PrP^{C}) in eine β -Faltblatt Struktur (PrP^{Sc}) (Pan, *et al.*, 1993).

In früheren Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit S. Weiss eine *in vitro* Selektion am rekombinant hergestellten Prionprotein (PrP) des Syrischen Goldhamsters (SHa) durchgeführt, mit dem Ziel, PrP-Isoform-spezifische Aptamere zu generieren (Weiss, *et al.*, 1997). Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der PrP-Aptamere.

4.3.1 Die Aptamer-Sequenzmotive und deren spezifische Wechselwirkung mit dem rekombinanten GST::PrP23-231

Die Sequenzierung der generierten Aptamere ergab, daß sich etwa 70% der erhaltenen individuellen Klone durch vier Regionen von hoch konservierten Guanosintriplets auszeichnen (Abb. 40, Anhang). Aufgrund ihrer individuellen Sequenzen wurden die erhaltenen Klone in drei unterschiedliche Familien eingeteilt, wobei Motiv I (Ap1) 10%, Motiv II (Ap2) 15% und Motiv III (Ap3) 15% der gesamten Klone darstellen. Weitere 30% der Sequenzen enthalten ebenfalls Guanosintriplets, welche aber durch unterschiedliche Basenabfolgen flankiert sind und somit keine Zuordnung zu einer der Sequenzfamilien möglich ist. Die verbleibenden 30% der erhaltenen Aptamere enthalten keine guanosinreichen Motive.

Zur Untersuchung der spezifischen Wechselwirkung repräsentativer Aptamere aus den einzelnen Sequenzfamilien wurden native Gelretardationsexperimente mit radioaktiv markierter RNA, rekombinantem GST::PrP23-231 oder einer N-terminal verkürzten Variante des Prionproteins das GST::PrP90-231 durchgeführt. Beide rekombinanten Proteine wurden im Insektenzellsystem exprimiert (Weiss *et al.*, 1995). Die spezifische Bindung der Nukleinsäureliganden an das Prionprotein kann nach Autoradiographie der Gele anhand eines langsameren Laufverhaltens

Ergebnisse

nachgewiesen werden (vgl. 3.5.3). Als Negativkontrolle wurde eine Sequenz untersucht, die keine repetitiven Guanosintriplets aufweist (z.B. Ap15, vgl. Abb. 40). In Abbildung 21 sind die Autoradiographien der Gelshiftexperimente und die postulierten G-Quartett-enthaltenden Sekundärstrukturen für drei Aptamere dargestellt, welche aus den unterschiedlichen Sequenzfamilien stammen. Das G-Quartettmuster besteht aus 3 Ebenen von Guanosintetraden.

Keine der untersuchten Sequenzen zeigt eine Interaktion mit dem N-terminal verkürzten, an GST fusionierten PrP90-231. Im Gegensatz dazu ist beim rekombinanten GST::PrP23-231 eine deutliche Komplexbildung mit allen drei G-Quartett ausbildenden Aptameren zu beobachten. Eine Bindung an GST ohne PrP-Anteil konnte weder für die angereicherte RNA-Bibliothek (Weiss, *et al.*, 1997) noch für den Monoklon Ap3 (Spur 4, Abb. 21 C) detektiert werden.

Ergebnisse

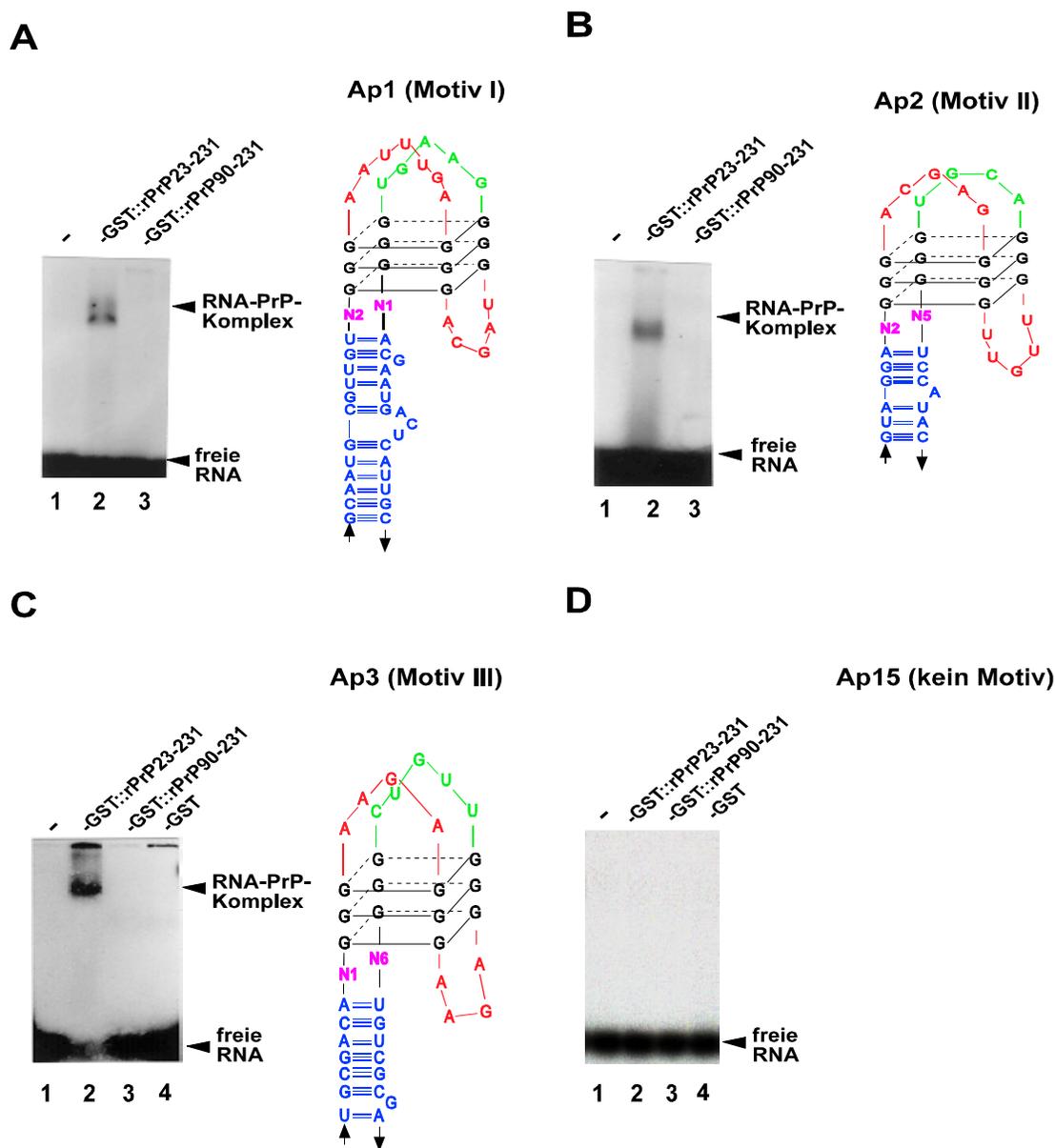


Abbildung 21 Gelretardationsexperiment mit radioaktiv markierten RNA-Aptameren. 4 pmol Ap1 (Abb. A, Motiv I), Ap2 (Abb. B, Motiv II), Ap3 (Abb. C, Motiv III) sowie Ap15 (Abb. D, kein Motiv) wurden mit rekombinanten GST::PrP23-231 (40 pmol) und GST::PrP90-231 (40 pmol) inkubiert. Für die Aptamere Ap3 und Ap15 ist zusätzlich die Bindung an das Fusionsprotein GST (40 pmol) untersucht worden (Spur 4, Abb. C), (Spur 4, Abb. D). Die postulierten G-Quartett enthaltenden Sekundärstrukturen für die einzelnen Motive sind neben dem entsprechenden untersuchten Aptamer dargestellt: Spur 1 freie RNA (Abb. A-D), Spur 2 retardiertes Bandenmuster der Aptamere Ap1 (Abb. A), Ap2 (Abb. B), Ap3

Ergebnisse

(Abb. C) in Gegenwart des GST::PrP23-231, Spur 3 (Abb. A-D) keine Komplexbildung zwischen Ap1, Ap2, Ap3 und Ap15 mit dem GST::PrP90-231, Spur 4, Abb. C, Spur 4, Abb. D keine Interaktion von Ap3 und Ap15 mit dem Fusionsprotein GST.

In einem weiteren Experiment zur Spezifitätsuntersuchung wurde das nicht radioaktiv markierte Ap1 in steigenden Konzentrationen zum Bindungsansatz mit radioaktiv markiertem Ap1 (2 pmol) und dem in gleichbleibender Konzentration vorliegenden GST::PrP23-231 (30 pmol) als spezifischen Kompetitor zugesetzt. In Abbildung 22 wird deutlich, daß mit steigender Konzentration an nicht markierten Nukleinsäureliganden Ap1 das Interaktionssignal zwischen dem radioaktiv markierten Aptamer (Ap1) und dem GST::PrP23-231 abnimmt. Dies zeigt, daß die Komplexbildung zwischen dem rekombinanten GST::PrP23-231 und dem Aptamermotiv I spezifisch ist. Bei der Verwendung des nicht radioaktiv markierten unselektierten Pool in einer Konzentration von 40 pmol anstelle der kalten Ap1-RNA im Inkubationsansatz war keine Reduktion der Bindung von radioaktiv markiertem Ap1 und dem GST::PrP23-231 detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

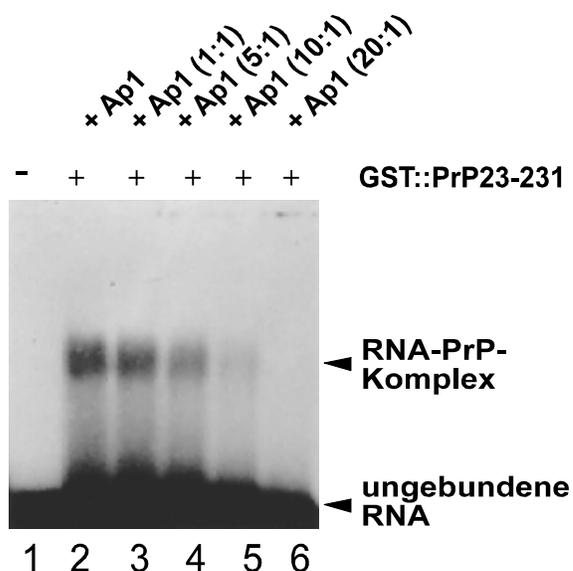


Abbildung 22 Spezifische Kompetition des Retardationssignals von Ap1(³²P) und GST::PrP23-231 durch nicht radioaktiv markierte Ap1-RNA in steigenden Konzentrationen. 2 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1-6) wurde mit 40 pmol GST::PrP23-231 (Spur 2-6) in Gegenwart von 2 pmol (Spur 3), 10 pmol (Spur 4), 20 pmol (Spur 5) und 40 pmol (Spur 6) nicht markiertem Ap1 inkubiert und auf einem 0,7%igem Agarosegel analysiert.

Die Substitution der hoch konserviert auftretenden Guanosinreste von Ap1 durch Uridinreste führt zum Verlust der Bindung an das rekombinante GST::PrP23-231. Auch das Antisensekonstrukt von Ap1 zeigt keine Interaktion mit GST::PrP23-231. Als Positivkontrolle wurde in beiden Fällen das nicht modifizierte Ap1 verwendet, welches unter den bereits beschriebenen Bedingungen eine Komplexbildung mit dem GST::PrP23-231 aufweist (vgl. Abb. 23).

Ergebnisse

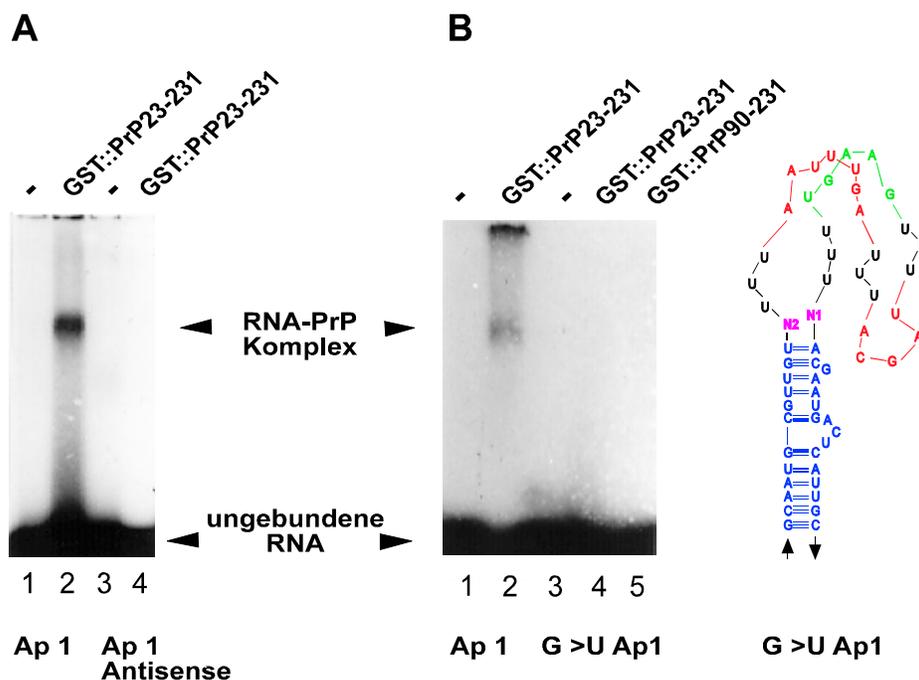


Abbildung 23 Gelretardationsexperiment zur Untersuchung der Interaktion zwischen rekombinalem GST::PrP23-231 mit Ap1, Antisense-Ap1 sowie Ap1 mit einer G→U Substitution im Bereich der hoch konservierten Guanosintripletts.

A) 4 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1 und 2) und Ap1 Antisense (Spur 3 und 4) wurden mit 40 pmol rekombinalem GST::PrP23-231 inkubiert (Spur 2 und 4).

B) 4 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1 und 2) und G→U Ap1 (Spur 3,4 und 5) wurden mit 40 pmol rekombinalem GST::PrP23-231 (Spur 2 und 4) oder 40 pmol rekombinalem GST::PrP90-231 (Spur 5) inkubiert.

4.3.2 Identifizierung der Interaktionsdomäne innerhalb von PrP^C in vitro

Zur Bestimmung der PrP-Interaktionsdomäne mit den selektierten Aptameren wurden verschiedene PrP-Fragmente in Fusion mit GST kloniert und exprimiert (Weiss, *et al.*, 1995). Im Kartierungsansatz wurde die radioaktiv markierte Aptamer-RNA mit den Peptiden eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Komplexe über native Gelelektrophorese analysiert. In Abbildung 24 ist eine repräsentative Autoradiographie für Ap1 dargestellt. Nur in Anwesenheit des Peptides GST::PrP23-52 wird eine Komplexbildung beobachtet. Die anderen fünf GST-Peptide zeigen

Ergebnisse

keine Bindung (Spur 3-7). Ap2 weist das gleiche Bindungsverhalten auf (Daten nicht gezeigt). Sowohl die Interaktion mit dem N-terminalen Prionpeptid GST::P23-52, als auch das Ausbleiben einer Komplexbildung mit dem rekombinanten GST::PrP90-231 führen zu der Annahme, daß der N-Terminus des Prionproteins die Interaktionsdomäne für die selektierten Aptamere darstellt.

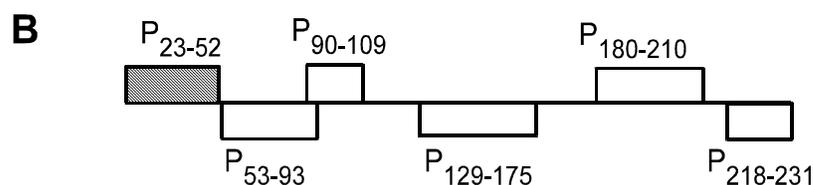
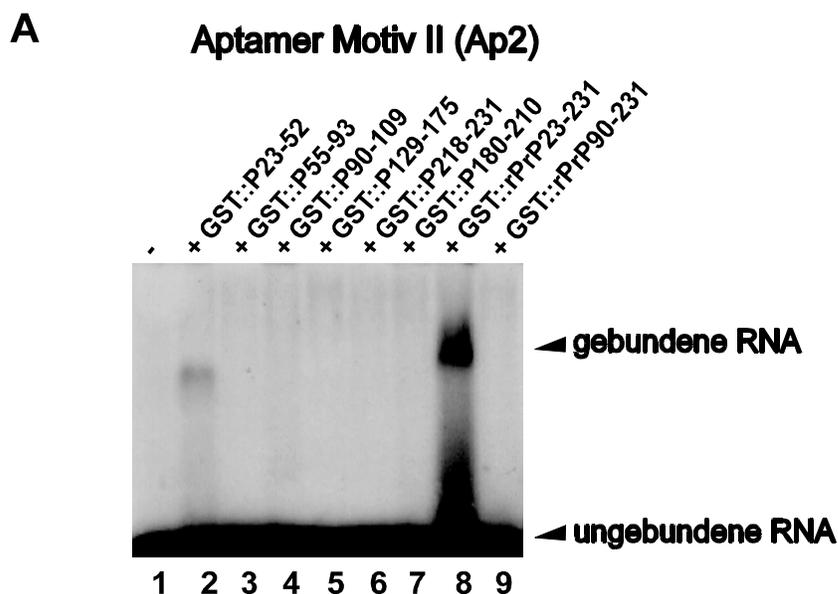


Abbildung 24 A) Bestimmung der Ap1-Interaktionsdomäne innerhalb des Prionproteins unter Verwendung rekombinanter GST-PrP-Fragmente: 4 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1-9) wurden mit 40 pmol GST::PrP23-231 (Spur 8), GST::PrP90-231 (Spur 9), 20 pmol GST::PrP23-52 (Spur 2), GST::PrP53-93 (Spur 3), GST::PrP90-109 (Spur 4), GST::PrP129-175 (Spur 5), GST::PrP180-210 (Spur 6) und GST::PrP218-231 (Spur 7) inkubiert und auf einem 0,7%igem Agarosegel analysiert.

Ergebnisse

B) Schematische Darstellung der potentiellen Interaktionsdomänen des Hamster Prionproteins mit Ap1. Die ermittelte Bindungsregion AS23-52 ist grau unterlegt.

4.3.3 Spezifische Interaktion der RNA-Aptamere mit endogenem Prionprotein aus Gehirnhomogenaten verschiedener Spezies

Vor dem Hintergrund einer diagnostischen Anwendung der selektierten Aptamere wurde untersucht, ob Ap1 und Ap2 in der Lage sind, natives Prionprotein aus Gehirnhomogenaten der Wildtyp Maus (wt Maus), des Hamsters und des Rindes zu binden. Als Negativkontrolle diente das Gehirnhomogenat einer PrP knock-out Maus (PrP^{0/0}) (Bueller, *et al.*, 1992). Bis auf das Fehlen des Prionproteins sollte eine vergleichbare Proteinzusammensetzung zwischen dem Gehirnhomogenat der Wildtyp Maus und der PrP knock-out Maus vorliegen. Die Gehirnhomogenate wurden freundlicherweise von Corinne Lasmezas (Commissariat A l' Energie Atomique, Fontenay-aux-Roses, France) zur Verfügung gestellt und wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben für den Bindungsassay vorbereitet. Nach einer einstündigen Inkubation der radioaktiv markierten RNA mit den Gehirnhomogenaten wurden die RNA-PrP-Komplexe auf einem nativen Agarosegel analysiert. In Abb. 25 ist zu erkennen, daß sowohl Ap1 als auch Ap2 in Gegenwart von Gehirnhomogenaten der Wildtyp Maus, des Hamsters und des Rindes (für Ap1) ein deutliches Interaktionssignal im Vergleich zur ungebundenen RNA zeigen. Im Falle der PrP knock-out Maus ist kein Interaktionssignal detektierbar, was zu der Annahme führt, daß das retardierte Bandenmuster auf eine Bindung der Aptamere an authentisches Prionprotein zurückzuführen ist. Eine Präferenz der Aptamere für ein bestimmtes Prionprotein innerhalb der untersuchten Gehirnhomogenate von Maus, Hamster und Rind konnte nicht festgestellt werden.

Ergebnisse

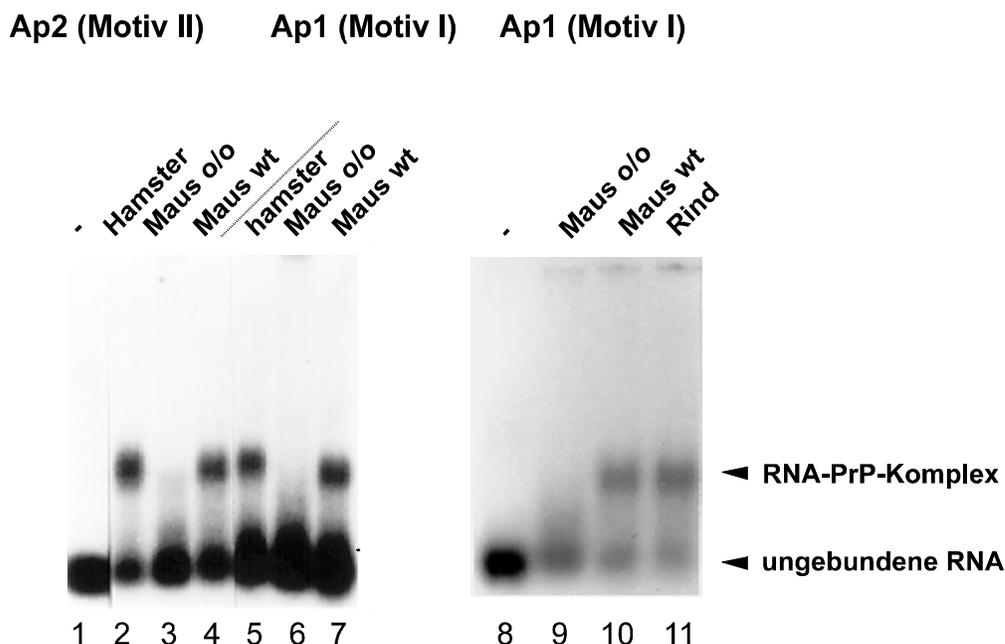


Abbildung 25 Untersuchung der Bindung von Ap1 und Ap2 an endogenes PrP in Gehirnhomogenaten unterschiedlicher Spezies: 1 pmol von radioaktiv markiertem Ap2 (Spur 1 bis 4) bzw. 1 pmol von Ap1 (Spur 5-11) wurden mit 10 μ l (20 μ g/ μ l) Hamster- (Spur 2 und 5), Rind- (Spur 11), PrP^{0/0} Maus- (Spur 3,6 und 9) und Wildtyp-Maus- (Spur 4,7 und 10) Hirnhomogenat inkubiert und auf einem 0,7%igem Agarosegel analysiert.

Um zu bestätigen, daß die erhaltenen Interaktionssignale auf eine spezifische Bindung zwischen den selektierten Aptameren und dem endogenen Prionprotein zurückzuführen sind, wurden in einem weiteren Gelshiftexperiment zusätzlich Prionprotein-spezifische Antikörper verwendet. Wenn eine PrP-Spezifität der Aptamere vorliegt, sollten diese die Mobilität der Aptamer-PrP-Komplexe in der Elektrophorese weiter verzögern. Zu diesem Zweck wurden zwei polyklonale PrP Antikörper verwendet: Ra 37-15, welcher gegen die Hamster PrP-Region AS 206-225 gerichtet ist und Ra 18, welcher die N-terminale Region des Hamster Prionproteins AS 37-53 bindet. Die Präinkubation der Hamsterhirnhomogenate mit den PrP-Antikörpern erfolgte eine Stunde bei 4°C, bevor die radioaktiv markierte Ap1 RNA zugesetzt wurde (vgl. 3.5.4). Das Präimmenserum des polyklonalen Antikörpers Ra 18 diente als Negativkontrolle. In Abb. 26 ist eine reduzierte

Ergebnisse

elektrophoretische Mobilität von Ap1 zu beobachten, welche auf die spezifische Interaktion von Ap1 mit endogenem Prionprotein aus Hamsterhirnhomogenaten zurückzuführen ist (Spur 2 und 6). Die Zugabe der Prionprotein-spezifischen Antikörper Ra 18 und Ra 37-53 führt zu einer zusätzlichen Verzögerung des Laufverhaltens, einem sogenannten Supershift (in Abb. 26 markiert durch einen Doppelpfeil). Dagegen konnte weder eine spezifische Bindung des Aptamers an die polyklonalen Antikörper (Spur 4) noch an das Präimmenserum (Spur 5) detektiert werden. Auch für die Kontrolle Präimmenserum, Hamsterhirnhomogenat und Aptamer ist kein Supershift zu beobachten (Spur 6). Der in Spur 3 und 7 festgestellte Supershift beruht auf einer spezifischen Interaktion des endogenen Prionproteins mit dem Aptamer in Gegenwart der Prionprotein-spezifischen Antikörper.

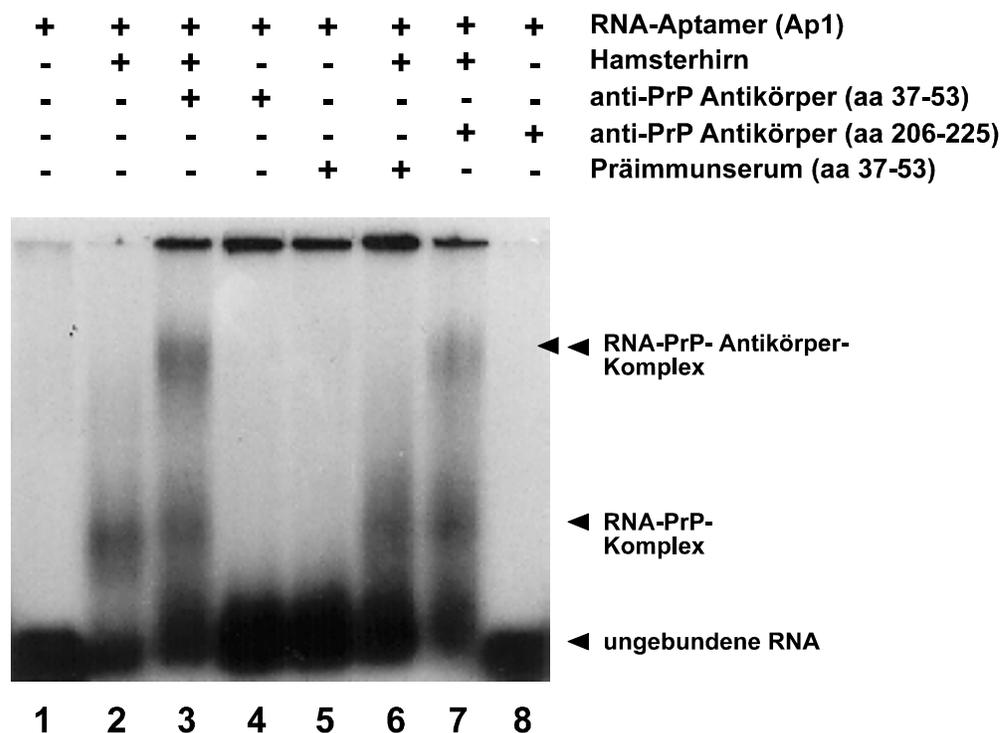


Abbildung 26 Interaktion des endogenen Prionproteins aus Hamstergehirn mit Ap1 in Gegenwart PrP-spezifischer Antikörper. 2 pmol von radioaktiv markiertem Ap1 (Spur 1-8) wurden inkubiert mit: 10 μ l Hamsterhirnhomogenat (20 μ g/ μ l) (Spur 2), 10 μ l

Ergebnisse

Hamsterhirnhomogenat (20 µg/µl) plus 12 µl Ra18 (Spur 3), 12 µl Ra18 in Abwesenheit von Gehirnhomogenat (Spur 4), 12 µl Präimmunserum (Spur 5), 10 µl Hamsterhirnhomogenat (20 µg/µl) plus 12 µl Präimmunserum (Spur 6), 10 µl Hamsterhirnhomogenat (20 µg/µl) plus 12 µl Ra37-15 (Spur 7), 12 µl Ra37-15 in Abwesenheit von Gehirnhomogenat (Spur 8). Die Ansätze wurden auf einem 0,7%igem Agarosegel analysiert.

Nachdem die Spezifität von Ap1 für das Prionprotein mit Hilfe von Supershiftexperiment gezeigt wurde, sollten das Antisense-Konstrukt von Ap1 und die G→U Ap1-Mutante (vgl. Material) auf ihre Bindungsfähigkeit an endogenes Prionprotein untersucht werden. Wie auch schon in Gegenwart des rekombinanten Prionproteins GST::PrP23-231 beobachtet wurde (vgl. Abb. 23), zeigen beide modifizierte Ap1 Varianten keine Interaktion mit endogenem PrP (vgl. Abb. 27).

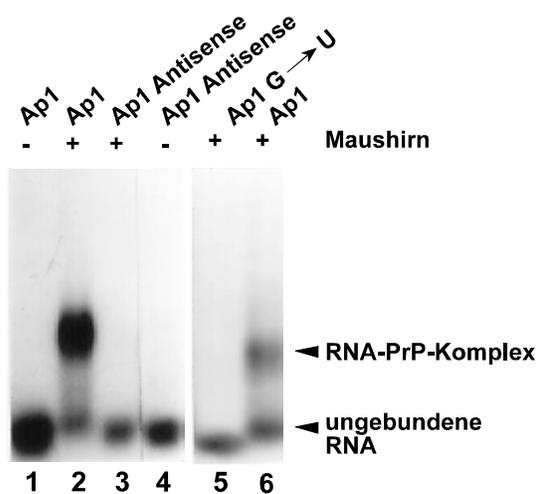


Abbildung 27 Interaktion von Antisense Ap1 und G→U Ap1 mit Gehirnhomogenaten der Maus und der PrP-überexprimierenden Maus. 2 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1 und 2) und 2 pmol radioaktiv markiertes Antisense Ap1 (Spur 3 und 4) wurden in Gegenwart von 10 µl (20 µg/µl) Gehirnhomogenat der PrP-überexprimierenden Maus (Tg35) inkubiert, 2 pmol G→U Ap1 (Spur 5) und 2 pmol Ap1 (Spur 6) wurden mit 10 µl (20 µg/µl) Gehirnhomogenat der Wildtyp-Maus inkubiert und auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen.

Ergebnisse

4.3.4 Vergleich der Aptamer-PrP-Interaktion in Gehirnhomogenaten nicht infizierter (PrP^C) und infizierter (PrP^{Sc}) Mäuse

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die selektierten Aptamere in der Lage sind, eine der beiden PrP-Isoformen PrP^C oder PrP^{Sc} spezifisch zu erkennen. Diese Versuche wurden von M. Neumann an der Universität Göttingen durchgeführt. Sowohl die Präparationen der Gehirnhomogenate, deren Vorbereitung für den Bindungsassay als auch der Bindungsansatz selbst erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Versuchsreihen mit nicht infektiösem Material (vgl. 3.4.5).

Abb. 28 zeigt, daß das retardierte Bandensignal in Gegenwart des Gehirnhomogenates der Scrapie-infizierten Maus (Spur 2) im Vergleich zur Interaktion mit PrP aus nicht infizierten Mäusen (Spur 4) und PrP-überexprimierenden Mäusen (Spur 3) deutlich abgeschwächt ist. Die Hirnhomogenate der $PrP^{0/0}$ -Maus als Negativkontrolle zeigen keine Komplexbildung (Spur 5).

Um auszuschließen, daß dieses abgeschwächte Signal im Falle des Scrapie-infizierten Materials auf Unterschiede hinsichtlich der aufgetragenen PrP Gesamtproteinmenge zurückzuführen ist, wurden die verwendeten Proteinlösungen in einem Westernblot (+/- Proteinase K Behandlung) mittels PrP-spezifischem Antikörper Ra5 analysiert. Ohne Proteinase K-Behandlung ist das diglykosylierte, 33-35 kDa große PrP^C bzw. PrP^{Sc} zusammen mit den einfach und nicht glykosylierten PrP-Formen sowohl bei infizierten als auch bei nicht infizierten Tieren vorhanden (vgl. Abb. 28 B). Schon 10 μ g PK pro μ l Proteinlösung führen bei nicht infiziertem Material zu einer vollständigen Degradation des zellulären Prionproteins (Spur 2, Abb. 28 B). Im Gegensatz dazu erhält man nach PK-Verdau (10 μ g PK/ μ l Proteinlösung) des Scrapie infizierten Materials das typische Dreibandenmuster von 30, 23 und 19 KDa, welches die unterschiedlichen Glykosylierungsstufen des PK resistenten, N-terminal verkürzten PrP widerspiegelt (Spur 5, 6 und 8, 9 Abb. 28 B). Die Westernblotanalyse der PrP-Lösungen, welche gleichzeitig in der Aptamerbindungsstudie verwendet wurden, zeigte, daß sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} in der Proteinlösung in annähernd gleichen Mengen vorhanden waren. Wie bereits beschrieben, führt ein PK-Verdau von zellulärem PrP zu einer

Ergebnisse

vollständigen Degradation, während die pathogene Isoform PrP^{Sc} lediglich N-terminal verkürzt wird. Eine Komplexbildung von Ap1 und PrP konnte nach PK-Behandlung der Gehirnhomogenate jedoch nicht mehr beobachtet werden, d.h. alle radioaktiven Signale befinden sich auf Höhe der ungebundenen RNA (Spur 6 bis 9, Abb. 28 A). Dieses Resultat zeigt, daß wie bereits im Peptidmapping mittels rekombinant hergestellter PrP-Fragmente demonstriert (vgl. Abb. 24), der N-Terminus von PrP für die Interaktion mit dem Aptamer Ap1 notwendig ist.

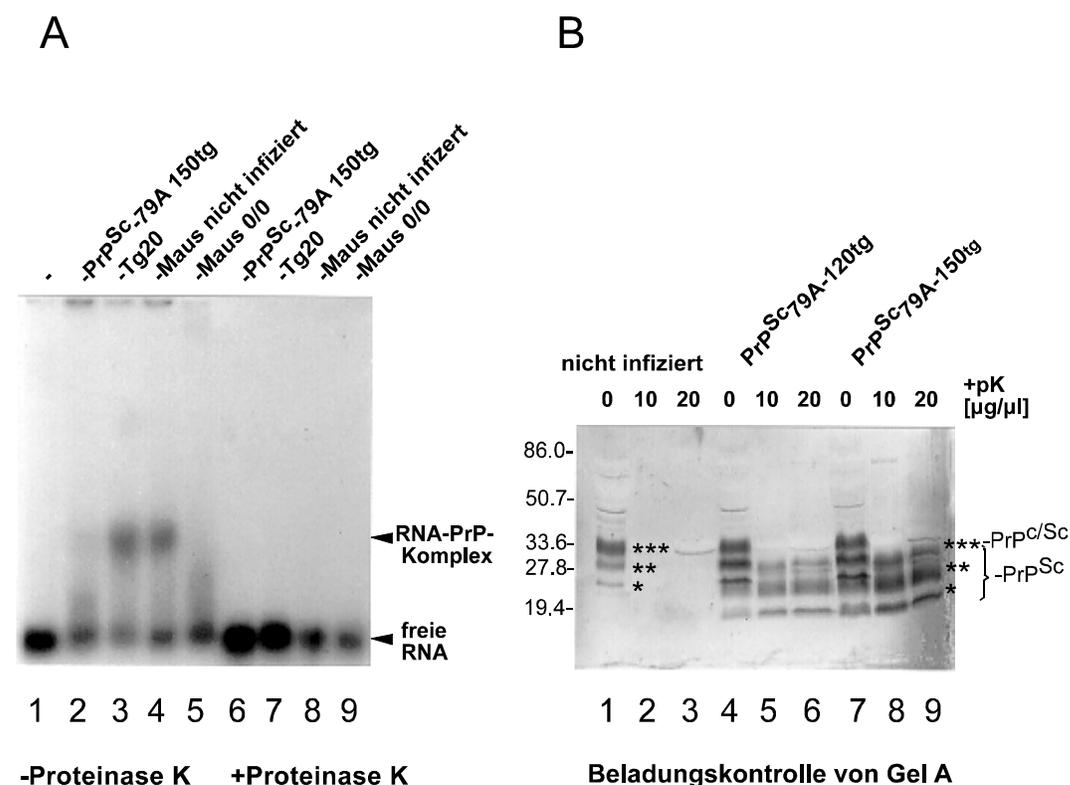


Abbildung 28 Aptamerinteraktion mit Gehirnhomogenaten von infizierten und nicht infizierten Mäusen

A) 1 pmol radioaktiv markiertes Ap1 (Spur 1-9) wurde mit PK behandeltem Gehirnhomogenat (Spur 6-9) bzw. nicht PK-behandeltem Gehirnhomogenat (Spur 2-5) inkubiert: Spur 2 und 7 nicht infizierte PrP-überexprimierende Maus (Tg20), Spur 4 und 8 nicht infizierte wt Maus, Spur 5 und 9 nicht infizierte PrP-Knock-out -Maus (PrP^{0/0}), Spur 2 und 6 Scrapie-infizierte Maus des Stammes 79, 150 Tage nach Infektion (PrPSc-79A 150tg).

B) Westernblotanalyse zur Beladungskontrolle der im Aptamerbindungsassay verwendeten

Ergebnisse

Proteinlösungen: 10 µl Gehirnhomogenat (10%v/v) der nicht infizierten Maus (Spur 1 bis 3), der Scrapie-infizierten Maus 120 Tage nach Infektion (Spur 4-6), der Scrapie-infizierten Maus 150 Tage nach Infektion (Spur 7-9).

Die Proben wurden für 30 min bei 37°C mit PK behandelt (10 µg/µl PK-Behandlung (Spur 2, 5 und 8), 20 µg/µl PK-Behandlung (Spur 3, 6 und 9)), mit SDS Probenpuffer versetzt, auf einem 12,5%igem PAA-Gel elektrophoretisiert (vgl. 3.4.3) und auf Nitrozellulose geblottet. Der Blot wurde mit dem Antikörper Ra5, welcher gegen das Maus PrP Epitop AS 95-110 gerichtet ist, abgegriffen. Die molekularen Größenmarker sind auf der linken Seite in kDa angegeben (nicht glykosyliertes PrP, ** monoglykosyliertes PrP, *** diglykosyliertes PrP).*

Ergebnisse

4.4 *In vitro* Selektion von RNA-Molekülen an einer ausgewählten Region des humanen Prionproteins (AS 90-129) und deren funktionelle

Charakterisierung

Bis heute ist es weder gelungen, die physiologische Funktion des zellulären Prionproteins (PrP^C) noch den Mechanismus der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} eindeutig aufzuklären. Es wird diskutiert, daß der PrP-Bereich (AS 90-141) von funktioneller Bedeutung für die Konversion von zellulärem PrP^C zur pathogenen Isoform PrP^{Sc} und Amyloidakkumulation ist. So konnten Gasset *et al.* zeigen, daß die Region 109-122, insbesondere die Aminosäureabfolge: AGAAAAGA, eine hohe Tendenz zur Ausbildung von Amyloiden aufweist (Gasset *et al.*, 1992). Ferner wurde für diese Region eine konformationelle Plastizität postuliert, die für die Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} notwendig ist (Peretz, *et al.*, 1997). Entsprechend dazu konnte in NMR-Studien für den Bereich (AS 90-127) keine definierte Sekundärstruktur identifiziert werden (Zahn, *et al.*, 2000). Hölscher *et al.* demonstrierten in Zellkulturstudien durch transiente Expression von PrP-Mutanten mit Deletion des Bereichs AS 114-121, daß diese PrP-Mutante nicht zu PrP^{Sc} konvertiert werden kann und zudem die Akkumulation von endogenem PrP^{Sc} transdominant reduziert (Hölscher, *et al.*, 1998). Umgekehrt konnte in transgenen Mäusen (Tg(PrP106)Prnp^{0/0}) gezeigt werden, daß ein Miniprionprotein von 106 Aminosäuren, bei welchen die Bereiche AS 23-88 und AS 141-176 deletiert waren, typische PrP^{Sc}-Charakteristika zeigt (Supattapone, *et al.*, 1999).

Ziel der folgenden *in vitro* Selektion war es, stabilisierte 2'-Amino-2'-deoxypyrimidine Nucleinsäuremoleküle zu generieren, die durch die Bindung an dieses Epitop die Biogenese von PrP^{Sc} beeinflussen. Für die Selektion wurde ein verkürzter Abschnitt von AS 90-129 des funktionellen Bereiches AS 90-141 des humanen PrP ausgewählt. Für die AS-Region 128-131 wird eine definierte Sekundärstruktur (β -Faltblatt) beschrieben, die unter Selektionsbedingungen nicht korrekt gefaltet wird und damit für die Selektion nicht geeignet erschien (Zahn, *et al.*, 2000). Aus der vorangegangenen Studie von PrP-spezifischen Aptameren an rekombinantem Hamster-Prionprotein (vgl. Kapitel 4.3) ging zudem hervor, daß der N-Terminus bei Verwendung des Gesamtproteins als Targetmolekül in der *in vitro* Selektion als

Ergebnisse

Bindungsdomäne bevorzugt wird. Man ging demzufolge zu einer alternativen Selektionsstrategie über, um Aptamere gegen ein ausgewähltes Epitop des Prionproteins zu isolieren.

4.4.1 Das Vorgehen bei der in vitro Selektion

Bei der Selektion von stabilisierten Prionpeptid-Aptameren wurde ein affinitätschromatographisches Verfahren verwendet, bei dem das Peptid 90-129 über einen N-terminalen Cysteinrest an Thiolsepharose 4B immobilisiert war (vgl. Abb. 29).



Abbildung 29 Selektionstarget: Humanes Prionpeptid AS 90-129, welches über einen zusätzlichen N-terminalen Cysteinrest an Thiolsepharose 4B gekoppelt wurde.

Der Ablauf dieser Selektion entspricht weitgehend dem Vorgehen bei der Selektion der NPY-spezifischen Aptamere und ist in den Abbildungen 30 und 31 zusammengefaßt. Im ersten Zyklus wurden 8,4 Kopien des Pools Mic Mod 40N (vgl. Abb. 8) eingesetzt. Für die Präselektion wurde die doppelte Menge an Vorsäulenmaterial (Thiolsepharose 4B) im Vergleich zum derivatisierten Material (Thiolsepharose 4B immobilisiert mit dem Prionpeptid AS90-129) verwendet. Die gleichbleibend niedrigen Werte in der Präselektion zeigen, daß keine unspezifischen Vorsäulenbinder angereichert wurden (vgl. Tab. 8, Tab. 9). Durch die Verwendung von 0,5%igem SDS-Puffer in den Zyklen 1-9a gelang eine vollständige Elution der gebundenen Aptamere. In den Zyklen 2 und 3 kam es zu einer ca. 4%igen Anreicherung an peptidgebundenen RNA-Molekülen, was im Zyklus 4 trotz vergleichbarer Konzentrationen nicht zu beobachten war. In einem Parallelansatz im folgenden Selektionsschritt konnte diese Beobachtung aufgeklärt werden. In den Zyklen 2, 3 und 5b wurde die RNA nach der Präselektion nicht direkt in die Selektion eingesetzt, sondern gefällt (vgl. 3.3.2) und erneut de- und renaturiert. Im Zyklus 5a dagegen wurde die RNA direkt nach der Präselektion zur Selektion verwendet.

Ergebnisse

Dabei wurden nur 0,18% der RNA-Bibliothek an dem Peptid zurückgehalten. Der Unterschied von Ansatz 5a im Vergleich zu Ansatz 5b ist demzufolge auf die Behandlung der RNA vor dem eigentlichen Selektionsschritt und den damit veränderten Salzbedingungen zurückzuführen. Die resultierende cDNA nach Zyklus 5a war Ausgangspunkt für die folgenden Selektionszyklen. Ein deutlicher Anstieg des Anteils an peptidgebundener RNA auf 11% war im Zyklus 7 zu beobachten. Die Zunahme an affinen RNA-Molekülen setzte sich in der achten Selektionsrunde fort, in der 24% der auf die derivatisierte Säule gegebenen RNA-Moleküle eluiert werden konnten.

Ergebnisse

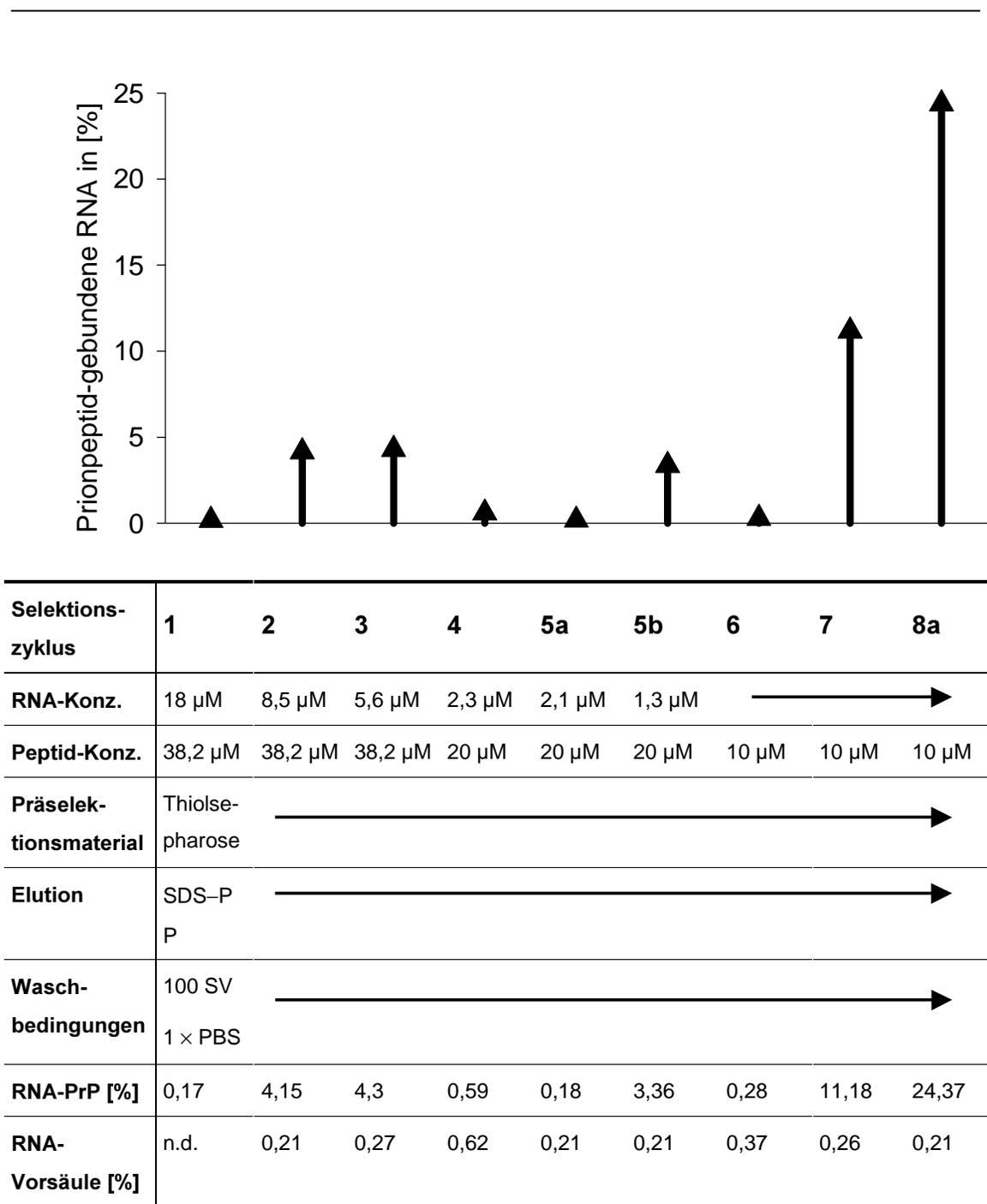


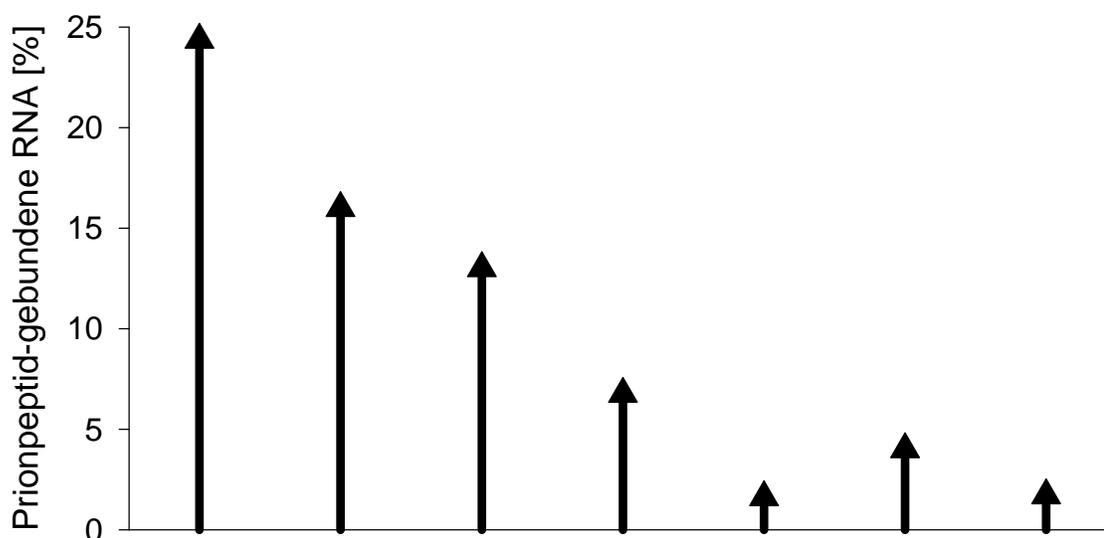
Abbildung 30 Der Verlauf der Selektion von Prionpeptid-spezifischen Aptameren bis zum achten Zyklus. Dabei ist der relative Anteil an spezifisch gebundener RNA in [%] für die einzelnen Selektionszyklen aufgetragen (Abszisse). Die Selektions- und Präselektionsbedingungen sowie die Ergebnisse der Selektion und Präselektion sind in der abgebildeten **Tabelle 8** wiedergegeben. Das Eluat von Zyklus 5a war Ausgangspunkt für die

Ergebnisse

weiteren Selektionsschritte (n.d. = nicht durchgeführt, SV = Säulenvolumen, SDS-PP = SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 3.7.2)).

Um besonders affine PrP-Binder aus der bereits angereicherten RNA-Bibliothek zu selektieren, wurde die Stringenz der Selektion in den folgenden Zyklen erhöht. Dies wurde durch die Erniedrigung des Derivatisierungsgrades der Prionpeptidsäule (vgl. Tab. 8 und Tab. 9, vgl. Kapitel 3.5.2.2) im Vergleich zum vorangegangenen Zyklus (Zyklus 8b, 9 und 10) und die Erhöhung der Waschvolumina (Zyklus 11) erreicht. Bedingt durch den zusätzlichen Selektionsdruck reduzierte sich der Anteil an gebundener RNA (vgl. Abb. 31, Tab. 9). In den Zyklen 9, 10 und 11 wurden nur die affinsten Binder, welche in 8b, 9b bzw. 11b eluiert worden waren, weiterverwendet. Da durch die unspezifische Elution mit SDS-Puffer eventuell bifunktionelle Aptamere, die das Prionpeptid nur im Komplex mit dem Matrixmaterial erkennen, angereichert werden könnten, ging man ab Zyklus 9b zur spezifischen Elution durch Reduktion der Disulfidbrücke zwischen den Thiolgruppen der Matrix und dem N-terminalen Cysteinrest des Peptides (vgl. Abb. 29) mittels 500 mM DTT über. Dabei wird deutlich (vgl. Abb. 31, Tab. 9, Zyklus: 9a und 9b), daß durch diesen Elutionsschritt nur etwa 50% der gebundenen RNA im Vergleich zur unspezifischen Elution mit SDS erhalten werden. Ein möglicher Grund für die Verringerung der Elutionsausbeute mit DTT ist die Maskierung und damit Unzugänglichkeit der Disulfidbrücke für DTT durch Ausbildung von Sekundärstrukturen des Peptides oder Konformationsänderungen des RNA/Peptid-Komplexes.

Ergebnisse



Selektionszyklus	8a	8b	9a	9b	10a	11a	11b
RNA-Konz.	1,3 µM	→					
Peptid-Konz.	10 µM	5,7 µM	2,9 µM	2,9 µM	1,4 µM	1,4 µM	1,4 µM
Präselektionsmaterial	Thiolspharose	→					
Elution	SDS-PP	SDS-PP	SDS-PP	DTT	DTT	DTT	DTT
Waschbedingungen	100 SV 1 × PBS	→					1000 SV 1 × PBS
RNA-PrP [%]	24,37	16	13	6,76	1,6	4	1,7
RNA-Vorsäule [%]	0,21	0,21	0,04	0,04	0,07	0,08	0,08

Abbildung 31 Verlauf der Prionpeptid-Selektion ab dem achten Selektionszyklus: Der relative Anteil an spezifisch gebundener RNA in [%] ist für die einzelnen Selektionszyklen aufgetragen (Abszisse). Die Selektions- und Präselektionsbedingungen sowie die Ergebnisse der Selektion und Präselektion sind in der **Tabelle 9** zusammengefaßt (SV=Säulenvolumen), (SDS-PP = SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 3.7.2)).

Ergebnisse

Nach 12 Zyklen wurde die Peptid-gebundene RNA eluiert, revers transkribiert, PCR-amplifiziert (vgl. 3.3.6) und die erhaltene dsDNA analog zur NPY-Selektion in den Vektor pGEM 4Z kloniert und 43 Klone sequenziert (vgl. 4.2.3, Abb. 7). Die Primärstruktur der erhaltenen Sequenzen erlaubt eine Einteilung in drei Sequenzfamilien (vgl. Abb. 32). Die Basenabfolge von Klon 7 der Familie I ist mit 25 identischen Sequenzen die am häufigsten vorkommende, hoch konservierte Sequenz der Prionpeptidselektion. Die Familie I repräsentiert mit 77 % den größten Anteil der erhaltenen individuellen RNA-Moleküle, während Familie II 14% ausmacht und Familie III etwa 7%. Neben den in Abbildung 32 gezeigten Sequenzfamilien wurde noch ein Klon (#27) selektiert, welcher keiner der Familien zuzuordnen ist. Die Mitglieder einer Familie unterscheiden sich nur durch Punktmutationen, Deletionen und Insertionen. Unter den drei Sequenzfamilien waren keine Sequenzhomologien feststellbar. Aus jeder Familie wurden repräsentative Sequenzen für eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) herangezogen.

Ergebnisse

Familie I

Klon	Sequenz
#7 (25)	GTGCTATGGA-GTGGAGGAGTTGAAGGTGTCGGGGTTGGC
#1 (2)	GTGCTATGGA-GTGGAGGAG A TGAAGGTGTCGGGGTTGGC
#5	GTGCTATGGA-GTGGAT T GAGT-GAAGGTGTCGGGGTTGGC
#14	GTGCTATGGA-GTGGAGGAGT C GAAGGTGTCGGGGTTGGC
#16	GTGCTATGGA-GT G TAGGAGT C GAAGG-GTCGGGGTTGGC
#20	GTGCTATGGA-GT G TAGGAGTTGAAGGTGTCGGGGTTGGC
#21	GTGCTATGGA A GTGGAGGAGTTGAAGGTGTCGGGGTTGGC
#23	GTGCTATGGA-GTGGAGGAGTTGA A TG-GTCGGGGTTGGC

Familie II

#2 (2)	TAGGAGGTGTGAAGGTGGGGTAGGATAGGAAGTTAACC
#11 (3)	TAGGAGGTGTGAAGGTGGGGTAGGATAGGAAGTTA-CC
#35	TAGGAGG-GTGAAGGTGGGGTAGGATAGGAAGTTAACC

Sequenz Familie III

#6	TCCCGAAGGTGGGGCGTAGAGGGGAGATGCGGTGCG--CTGA
#38	TCCCGAAGGTGGGGCGTAGAGGGGAGATGCGGTGCG GC CTGA
#22	TCC-GAAGGTGGGGCGTAGAGGGGAGATGCGGTGCG--CTGA

orphan

#27	ATAGAGTCCGGAAGGGTCAGCGGAGGCTGGGTGTGGAGG
-----	---

Abbildung 32

Sequenzen der Klone aus der Prionpeptid-Selektion (ohne Primerbindungsstellen), wobei für jeden Klon nur die ursprünglich randomisierte Region 40N gezeigt ist. Die Anzahl mehrfach isolierter Sequenzen unter den 43 analysierten Klonen ist in Klammern angegeben. Die 2'-Amino-2'-deoxycytidin und 2'-Amino-2'-deoxyuridine Reste sind als C oder T bezeichnet. Mutationen und Deletionen (-) innerhalb einer Familie im Vergleich zur ersten dargestellten Sequenz sind fett hervorgehoben.

Ergebnisse

4.4.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten individueller Sequenzen durch Nitrozellulosefilterbindungsstudien am Prionprotein

Bevor man zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten repräsentativer Sequenzen aus der Prionpeptidselektion am rekombinanten Prionprotein überging, wurde die Bindungsfähigkeit der ausgewählten Klone und einer zufälligen Sequenz aus dem unselektierten Pools am immobilisierten Prionpeptid getestet. Dabei wurde ein molares Verhältnis von Peptid : RNA von 2:1 eingesetzt. In Abbildung 33 ist zu erkennen, daß alle untersuchten Klone mit Ausnahme der unselektierten Sequenz das Prionpeptid binden können, wobei sich die repräsentativen Sequenzen aus Familie I (#7) und Familie III (#6) im Vergleich zur Familie II (# 2) und der einmalig vorkommenden Sequenz (#27) in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden.

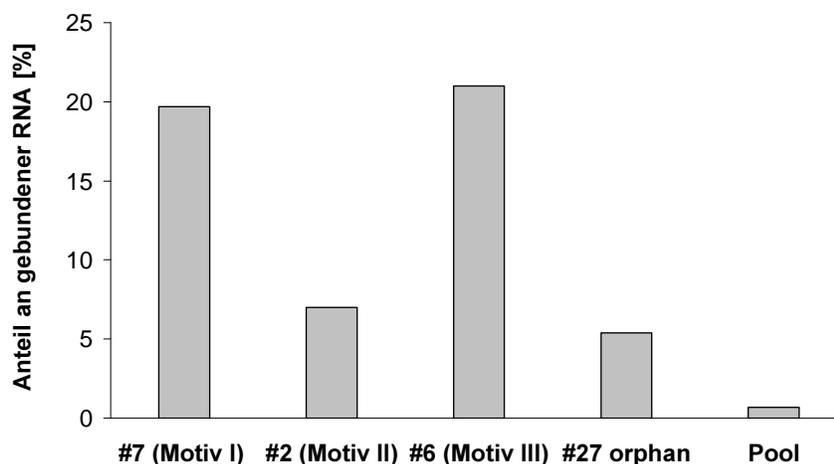


Abbildung 33 Relative Bindung verschiedener Sequenzmotive und des unselektierten Pools am Prionpeptid AS 90-129. Die Bindungsreaktion wurde mit immobilisiertem Prionpeptid (400 pmol), radioaktiv markierter RNA (200 pmol) in PBS Bindungspuffer (pH 7,4) und 1 µg/µl Heparin durchgeführt. Auf der Ordinate ist der relative Anteil an peptidgebundener RNA zur eingesetzten Gesamtradioaktivität (100%) dargestellt.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante der individuellen Sequenzen wurde das zum damaligen Zeitpunkt einzig verfügbare rekombinante Prionprotein des Hamsters (*Prionics*) verwendet. Alle weiteren Charakterisierungen der Aptamere wurden in persistent Prion-infizierten ScN₂a-Zellen, die mit einem chimären Maus-

Ergebnisse

Hamster-Maus PrP-Konstrukt stabil transfiziert worden sind (vgl. 3.6.4), durchgeführt. Dabei liegt der Bindungsbereich des Aptamers in der dem Hamsterprionprotein entsprechenden Domäne des Chimäres.

Die beiden Spezies Mensch (Selektionspeptid) und Hamster weisen im Bereich 90-129 eine große Sequenzhomologie auf. Sie unterscheiden sich nur durch einen Aminosäureaustausch an Position 96 (Schatzl, *et al.*, 1995). Das rekombinante PrP wurde in steigenden Konzentrationen (10 nM-10 μ M) mit radioaktiv markierter RNA (3 nM) im Bindungspuffer in Gegenwart von 1 μ g/ μ l Heparin und 1 mM MgCl₂ inkubiert. Heparin wurde sowohl als unspezifischer Kompetitor als auch zur Verbesserung der Löslichkeit des sehr schnell zur Präzipitation neigendem PrP zugesetzt. Über Nitrozellulosefiltration wurde gebundene von ungebundener RNA separiert (vgl. 3.5.1) und die auf der Filtermembran zurückgehaltene, komplexierte RNA mittels Phosphorimager quantifiziert. Aus den erhaltenen Bindungskinetiken wurden durch Verwendung der Gleichung 1 (vgl. 3.5.1) die in der Tabelle 10 dargestellten Dissoziationskonstanten für die einzelnen Klone berechnet. Für den unselektierten Pool konnte kein K_d-Wert bestimmt werden, da bei einer Proteinkonzentration von 10 μ M zwar 8% an unselektierter RNA komplexiert vorlagen, jedoch keine Sättigungskonzentration des Prionproteins erreicht wurde. Im Falle der bindenden Sequenzen wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μ M ca. 40-50% (#2, #7) bzw. 30-35% (#6, #27) der eingesetzten RNA gebunden. Die Verwendung von höheren Proteinkonzentrationen zur exakten K_d-Bestimmung, ist aufgrund der Präzipitation von PrP selbst in Gegenwart verschiedener Detergentien nicht möglich.

Es konnte jedoch in den Filterbindungsstudien gezeigt werden, daß die selektierten Prionpeptidaptamere auch in der Lage sind, das gesamte rekombinante Prionprotein in Lösung zu erkennen (vgl. Tab. 10). Entsprechend den Peptidbindungsstudien (vgl. Abb. 33) weisen die Klone aus den Sequenzfamilien I und III die höchste Affinität zum rekombinanten PrP auf. Für die weiteren Untersuchungen im Zellkultursystem wurde Aptamer #7, welches sich durch die beste Affinität und das beste Komplexbildungsverhalten (50%) innerhalb der analysierten Sequenzen auszeichnet, herangezogen.

Ergebnisse

	Klon	Kd (μM)
Motiv I	#7	1,3
Motiv II	#2	10,1
Motiv III	#6	2,7
Orphan	#27	6,9
Pool	#11	n.d.

Tabelle 10 Dissoziationskonstanten (Kd-Werte) für die Bindung individueller Sequenzen verschiedener Motive an das rekombinante Prionprotein des Hamsters (Prionics), welche im Filterbindungsassay ermittelt wurden (n.d. nicht definierbar). Die Gleichung zur Berechnung der Dissoziationskonstanten ist in Kapitel 3.5.1 angegeben.

4.4.3 Einfluß der Aptamere auf die Biogenese und Akkumulation von hochmolekularen PrP^{Sc}-Molekülen in Prion-infizierten Neuroblastomzellen

Im folgenden sollte in einem Modellsystem, den persistent Prion infizierten ScN₂a-Zellen, untersucht werden, ob das Motiv I Aptamer (#7) nach Zugabe in das Medium die Neuentstehung von PrP^{Sc} oder die Aggregation des neuentstandenen PrP^{Sc} zu hochmolekularen Aggregaten im Zellkultursystem beeinflusst. In Abb. 35 ist der Ablauf dieses Experimentes schematisch dargestellt.

Die verwendeten ScN₂a-Zellen stammen aus einer murinen Neuroblastomzelllinie, die zusätzlich zum endogenen Maus-PrP mit einem chimären Maus-Hamster-Maus (MHM₂) PrP-Konstrukt stabil transfiziert wurden (Scott *et al.*, 1992). Die Hamstersequenz (AS 94-131) enthält ein Epitop für den monoklonalen Prionproteinantikörper 3F4, welcher für die selektive Immunpräzipitation von PrP im weiteren Verlauf dieses Experimentes genutzt wurde. Kontrollansätze waren sowohl die unselektierte Pool-RNA als auch ein Ansatz ohne RNA. Um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können, wurde das Experiment sechsmal wiederholt.

Die Stabilität der 2'Amino-2'deoxy modifizierten Motiv I-RNA (#7) als auch der unselektierten Pool RNA wurde über 48 Stunden in 10%igem FKS in MEM-Medium

Ergebnisse

untersucht. Dabei konnte für die Motiv I RNA und Pool-RNA keine Degradation innerhalb von 16 Stunden festgestellt werden (vgl. Abb. 34).

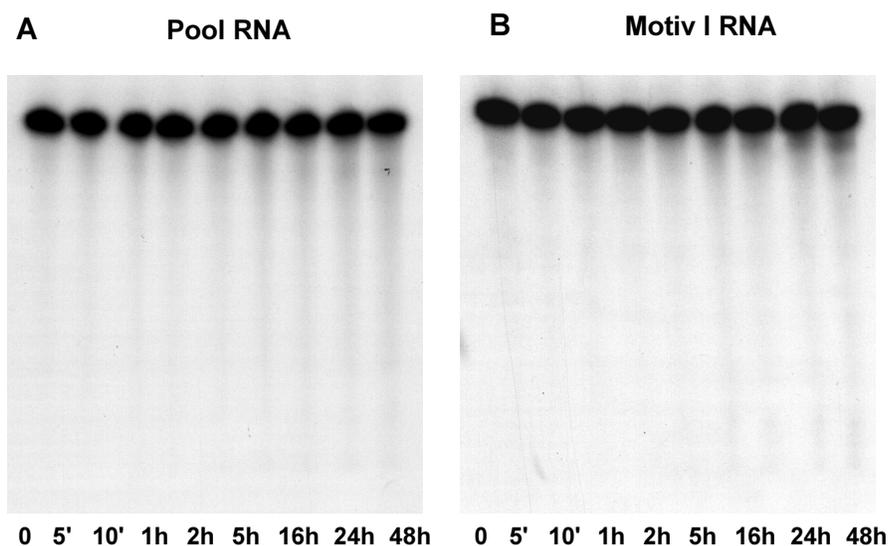


Abbildung 34 Stabilität von 2'-Amino-2'-deoxy-pyrimidin (2'NH₂) Pool-RNA (A) und 2'-Amino-2'-deoxy-pyrimidin (2'NH₂) Motiv I-RNA (B) in fötalem Kälberserum. 60 pmol 2'NH₂ bzw. 2'OH RNA wurden jeweils in 200 µl MEM Puffer versetzt mit 10% FKS bei 37°C für 24 bzw. 48 h Stunden inkubiert. Ein 20 µl Aliquot wurde von jedem Reaktionsansatz nach den entsprechenden Zeiten entnommen und auf einem 15%igem PAA-Gel aufgetragen (vgl. 3.2.3).

Ergebnisse

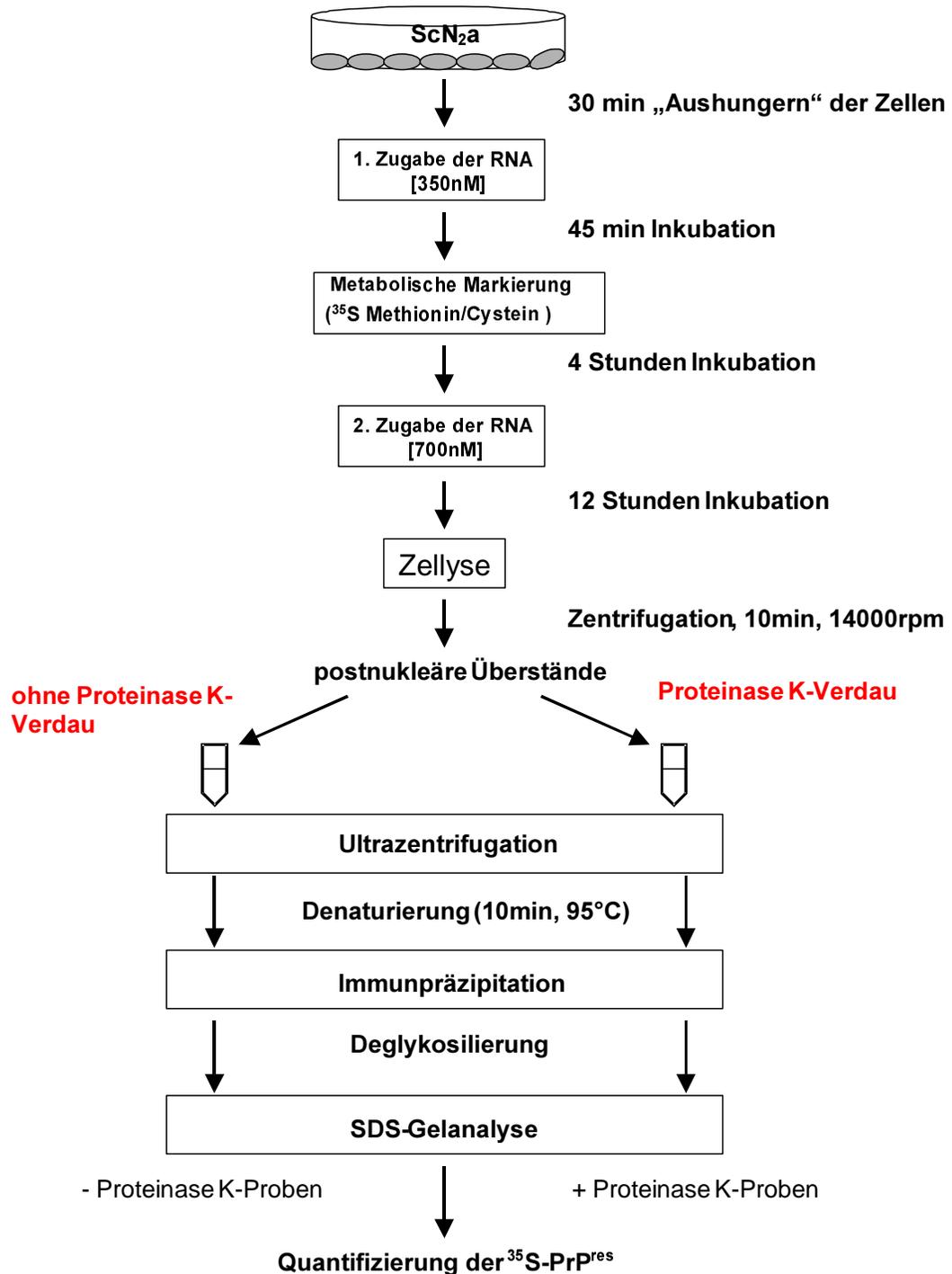


Abbildung 35 Experimentelle Konzeption zur Untersuchung des Einflusses der Aptamere auf die Biogenese und Akkumulation von hochmolekularen PrP^{Sc}-Molekülen in Prion-infizierten Neuroblastomzellen (vgl. 3.6.4). Die konfluent gewachsenen Zellen wurden

Ergebnisse

30 min in Methionin/Cystein-freiem Medium ausgehungert, dann wurde die RNA das erste Mal in das Zellkulturmedium gegeben, wobei eine Konzentration von 350 nM im Medium eingestellt wurde. Nach 45 min Inkubation wurden jeweils 800 μ Ci 35 S-Methionin/Cystein hinzugegeben. Eine zweite Zugabe der RNA erfolgte nach weiteren 4 h, so daß am Ende eine Konzentration von 700 nM RNA im Medium vorlag. Nach insgesamt 16 h metabolischen Labelings wurden die Zellen lysiert, zentrifugiert und jeweils die Hälfte der postnukleären Überstände mit Proteinase K behandelt (PK: 20 μ g/ml, 30 min, 37°C). Um PrP^{Sc} von PrP^C abzutrennen, wurden beide Ansätze (+PK und -PK) in Gegenwart von 1% Sarkosyl ultrazentrifugiert (1 h, 4°C, 100000g). Das sedimentierte PrP^{Sc} wurde wieder resuspendiert, denaturiert (10 min, 95°C) und mit Hilfe des 3F4-Antikörpers immunpräzipitiert (Taraboulos *et al.*, 1992). Nach der Deglykosylierung der Proben (5 Units N-Glykosidase F) wurden sie auf einem 12,5%igem SDS-Gel (vgl. 3.4.3) aufgetrennt.

Nach insgesamt 12 Stunden radioaktiver Markierung mit 35 S-Methionin/Cystein in Gegenwart der RNA (700 nM) erfolgte die Zellyse, wobei jeweils die Hälfte der postnukleären Überstände separat ultrazentrifugiert wurde (vgl. Abb. 36, Spur 1-9). Die andere Hälfte wurde erst einer PK-Behandlung unterzogen und anschließend ultrazentrifugiert (vgl. Abb. 36, Spur 10-18). Durch den Ultrazentrifugationsschritt in Gegenwart von 1% Sarkosyl wird PrP^{Sc} sedimentiert, während PrP^C im Überstand des Ultrafiltrates verbleibt. Danach wurde das sedimentierte PrP^{Sc} resuspendiert und unter Verwendung des 3F4 Antikörpers immunpräzipitiert (vgl. Kapitel 3.6.4). Während durch Ultrazentrifugation der Proben 1-9 die Menge an *de novo* synthetisiertem und unlöslichem PrP^{Sc} erhalten wurde, waren die Untersuchungskriterien der Proben 10-18 sowohl die Unlöslichkeit als auch PK-Resistenz des *de novo* synthetisierten PrP^{Sc}.

Da maximal nur ca. 5% des neu translatierten PrP^C in PrP^{Sc} konvertiert werden (Taraboulos *et al.*, 1992), wurden die PrP^{Sc}-Proben nach der Immunpräzipitation und vor der Gelanalyse zur Verstärkung des 35 S-Signals mit N-Glykosidase F (5 Units) deglykosyliert. Dadurch konnte die Gesamtmenge an radioaktiv markiertem PrP^{Sc} quantifiziert werden.

In der Abb. 36 wird deutlich, daß das *de novo* synthetisierte, N-terminal trunkierte, immunpräzipitierte und deglykosylierte PrP^{Sc} mit einer Größe von 19 kDa in allen

Ergebnisse

analysierten Proben vorhanden ist. Da bei der Immunpräzipitation des *de novo* synthetisierten PrP^{Sc} ein PrP-spezifischer Antikörper (3F4) verwendet wurde, der nicht an das endogene murine PrP binden kann, ist das erhaltene radioaktive PrP-Signal nur auf das chimäre Maus-Hamster-Maus-Konstrukt zurückzuführen.

Die Quantifizierung dieser Signale zeigt, daß die absolute Menge an *de novo* synthetisiertem, unlöslichem PrP^{Sc} durch den Zusatz von Aptamer #7 (Spur 7-9) im Vergleich zur Pool-RNA (Spur 4-6) bzw. dem Pufferansatz (Spur 1-3) nicht beeinflusst wird. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß der relative Anteil an PK-resistentem Material bezogen auf den Anteil des nicht PK-behandelten, unlöslichen PrP^{Sc} in Gegenwart von Aptamer #7 (Spur 16-18) im Vergleich zu den Kontrollansätzen reduziert wird (vgl Tab. 11). Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimentreihen mit jeweils 3 Parallelansätzen/pro Versuchsgruppe ermittelt.

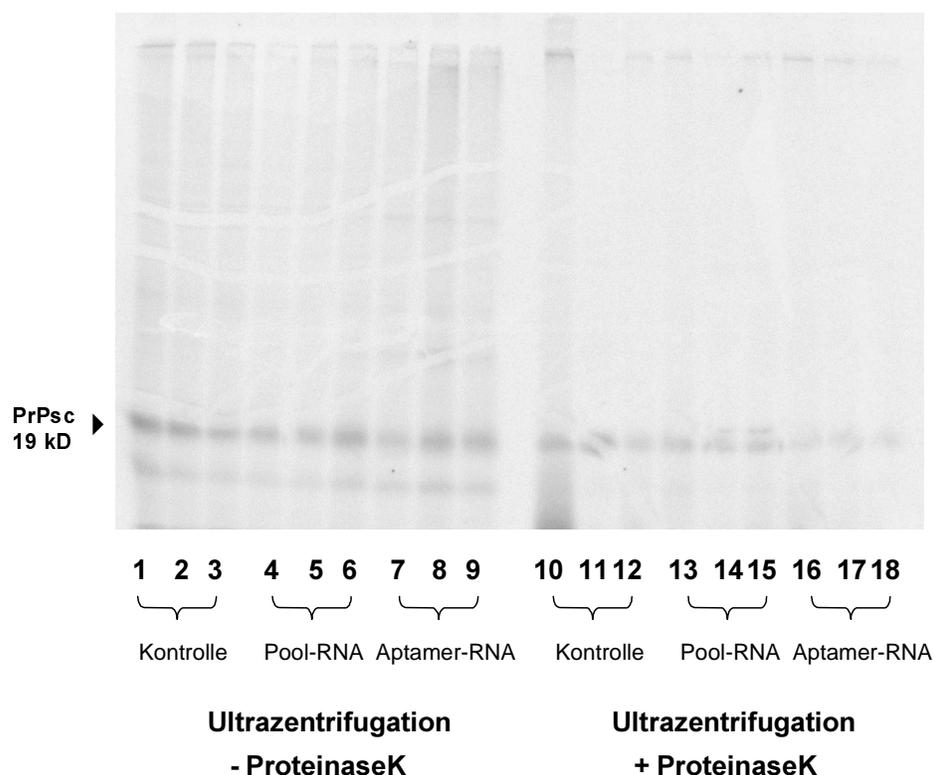


Abbildung 36 Repräsentative Analyse des *de novo* synthetisierten PrP^{Sc} aus persistent Prion-infizierten Zellen:

Ergebnisse

Spur 1-9 unlösliches PrP^{Sc}, Spur 10-18 unlösliches, PK-resistentes PrP^{Sc},
Spur 1-3 und 10-12 Kontrollansatz ohne RNA, Spur 4-6 und Spur 13-15 Behandlung mit Pool-RNA, Spur 7-9 und Spur 16-18 Behandlung mit #7 Aptamer. Die Proben wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel (vgl. 3.4.3) aufgetragen.

	Motiv I-RNA (#7)	Kontrolle	Pool-RNA
	+PK/-PK [%]	+PK/-PK [%]	+PK/-PK [%]
Ansatz 1	39,5	77,8	62,8
Ansatz 2	33,8	74	70,3
Ansatz 3	44,2	100	73,7
Ansatz 4	57,6	80	90
Ansatz 5	58	54	79
Ansatz 6	47,6	n.d.	93
Mittelwert	46,8	77,1	78,1
Standartabweichung	8,8	14,6	10,6

Tabelle 11 Quantifizierung des PK-resistenten PrP^{Sc}-Anteils in Relation zur Gesamtmenge an *de novo* synthetisiertem PrP^{Sc}. Zur Berechnung wurde das am Phosphorimager gemessene ³⁵S-Signal des Ansatzes mit Proteinase K (+PK)-Behandlung durch das ³⁵S-Signal des gleichen Ansatzes ohne Proteinase K (-PK)-Behandlung geteilt. Die Ergebnisse sind in % angegeben. Es sind die Daten aus 6 unabhängigen Versuchen aufgeführt.

In der statistischen Betrachtung (Student-t-TEST) der Ergebnisse aller sechs Versuche (vgl. Tab. 11) zeigt sich, daß der Zusatz von Aptamer #7 im Vergleich zur Pool-RNA ($p = 0,001$) und dem Kontrollansatz ohne RNA ($p = 0,004$) zu einer signifikanten Reduktion des relativen Anteils an PK-resistentem Material führt.

Die Ansätze ohne RNA bzw. mit Pool-RNA zeigen im Gegensatz dazu bzgl. des relativen Anteils an PK-resistentem Material untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede (p -Wert Pool gegen Puffer= 0,9). In Abb. 37 sind die Ergebnisse der Experimentreihen zusammengefaßt und die erhaltenen Durchschnittswerte gegeneinander aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, daß die Reduktion des relativen Anteils an *de novo* synthetisiertem, PK-resistentem PrP in

Ergebnisse

Gegenwart der Aptamer-RNA # 7 mit 53% im Vergleich zur Pool-RNA mit 22% bzw. der PBS-Kontrolle mit 23% deutlich effektiver ist.

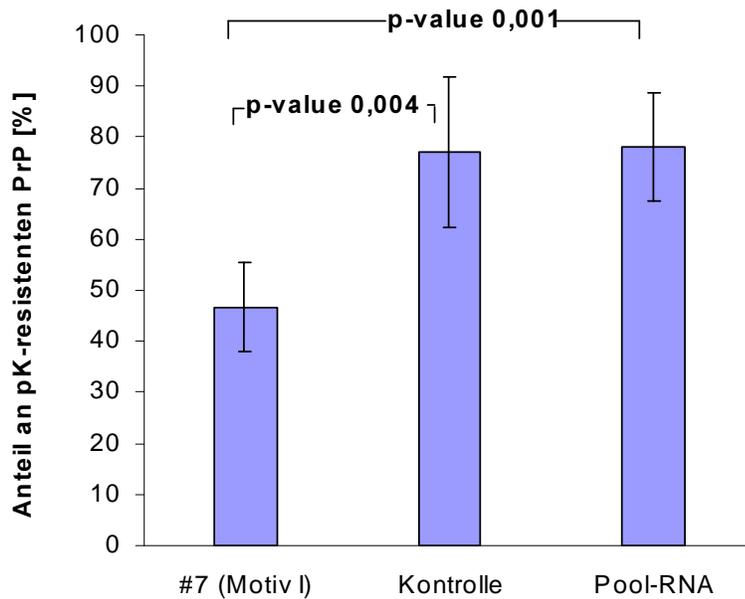


Abbildung 37 Die Säulendiagramme stellen den relativen Anteil an Proteinase K-resistenten PrP^{Sc} bezogen auf die Gesamtmenge des de novo synthetisierten PrP^{Sc} dar. Die Prion-infizierten N₂a-Zellen wurden mit 0,7 µM Aptamer-RNA (Motiv I), 0,7 µM Pool-RNA bzw. PBS-Puffer inkubiert.

5 Diskussion

- 5.1 Die Selektion und *in vitro* Charakterisierung von NPY-spezifischen Aptameren
- 5.2 Die Pionproteinspezifischen Aptamere
- 5.3 Die Prionpeptidspezifischen Aptamere

5.1 Die Selektion und *in vitro* Charakterisierung von NPY-spezifischen Aptameren

Das Neuropeptidhormon NPY ist an einer Vielzahl von physiologischen Steuerungsprozessen im menschlichen Organismus beteiligt. Für die differentielle Regulation unterschiedlicher Zielorgane durch ein Peptid sind komplexe Ligand-Rezeptor-Interaktionen an verschiedenen G-Protein gekoppelten NPY-Rezeptorsubtypen notwendig. Das Bindungsverhalten von NPY an seinen verschiedenen Rezeptorsubtypen ist nicht vollständig verstanden (vgl. Einleitung).

Ein Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Selektion von stabilisierten 2' amino-2'-deoxy RNA-Aptameren, die das Neuropeptid Y mit hoher Spezifität binden können, um damit ein selektives Werkzeug zur Charakterisierung der Wechselwirkung von NPY und seinen Rezeptorsubtypen zu schaffen.

Im Rahmen der Selektion war die Wahl geeigneter Selektionsbedingungen Voraussetzung zur Isolierung von Aptameren, welche unter physiologischen Bedingungen aktiv sind (vgl. 4.2.1). Da der vollständige C-Terminus des NPY essentiell für die Interaktion mit allen NPY-Rezeptorsubtypen ist (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000, vgl. Einleitung), wurde das Peptid N-terminal biotinyliert und an Streptavidinagarose gekoppelt, um die Zugänglichkeit des C-terminalen Epitops zu gewährleisten (vgl. Abb. 10).

Durch die von Zyklus zu Zyklus stark variierenden und in ihrer Stringenz zunehmenden Inkubations- und Waschbedingungen (vgl. Tabelle 6), wie die Erhöhung der Ionenstärke durch Zusatz von NaCl, der Zusatz des unspezifischen Kompetitors Heparin, die Verwendung von unterschiedlich geladenen immobilisierten Peptiden im Präselektionsschritt sowie durch die Inkubation des Selektionsansatzes in Gegenwart von 10% FKS, ist es gelungen sehr spezifische und selektive

Diskussion

Nukleinsäureliganden zu isolieren.

Die Sequenzierung der generierten Aptamere ergab, daß ca. 80% der analysierten Monoklone ein dominierendes Sequenzmotiv aufweisen (vgl. Abb. 14). Dabei unterschieden sich die Mitglieder dieser Familie zum Teil nur durch Punktmutationen und Deletionen.

Sequenzen häufig selektierter Struktur motive binden hochaffin

In Bindungsstudien an NPY wurden für die Sequenzfamilien I und II (DP3, DP4 und DP11) Dissoziationskonstanten von 370 nM bis 470 nM ermittelt. Im Gegensatz dazu weisen die einfach vorkommenden Klone eine niedrigere NPY-Affinität auf (vgl. 4.2.4). Die Mehrheit der selektierten und analysierten Aptamere ist in der Lage, das freie Peptid zu binden, obwohl diese in einem affinitätschromatographischen Selektionsprozess mit immobilisiertem NPY generiert wurden. Für DP3 wurden sowohl im Filterbindungsassay als auch in der analytischen Affinitätschromatographie quantitativ vergleichbare Dissoziationskonstanten bestimmt (vgl. 4.2.6). Diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür, daß NPY im löslichen oder immobilisierten Zustand eine ähnliche Konformation einnehmen kann und die potentiellen Bindungsdomänen in beiden Fällen für die Aptamere zugänglich sind.

Die Affinität der NPY-Aptamere zu ihrem Zielmolekül ist vergleichbar zu denen von bisher durchgeführten Peptidselektionen. Für das HIV-1REV Aptamer wurde beispielsweise ein K_d -Wert von 19 nM (Xu und Ellington, 1996), für das Substanz P-Aptamer von 190 nM (Nieuwlandt, *et al.*, 1995), für das CD18-cyt Peptid-Aptamer von 500 nM (Blind, *et al.*, 1999) und für das Vasopressin-Aptamer ein K_d von 900 nM (Williams, *et al.*, 1997) ermittelt. Die HIV-1REV-Aptamere zeigen aufgrund des hohen Anteils an positiv geladenen Argininresten (10 der insgesamt 17 Aminosäuren) des HIV-1REV Peptides, welches zudem ein natürlicher RNA-Bindungspartner ist, die höchste Affinität unter den anti-Peptidaptameren.

Da das Aptamer DP 3 die höchste NPY-Affinität verglichen zu den anderen untersuchten repräsentativen Sequenzen aufweist, wurde DP3 für die weitere Charakterisierung der NPY-Aptamer-Interaktion sowie für die anschließende NPY-NPY-Rezeptorsubtyp-Interaktion herangezogen.

Diskussion

Der vollständige C-Terminus von NPY ist obligat für die Rezeptor- und DP3 Bindung

Um die Bindungsregion von DP3 an NPY zu kartieren, wurden verschiedene Untereinheiten von NPY (N- und C-terminal verkürzte NPY-Varianten) sowie mutierte Varianten von NPY untersucht (vgl. 4.2.8).

Unserer Bindungsstudie zufolge wird der vollständige C-Terminus, insbesondere die Aminosäure Arginin an Position 33, für die Interaktion mit dem DP3-Aptamer benötigt. Das C-terminale Epitop von NPY stellt gleichzeitig die NPY-Interaktionsdomäne für die Wechselwirkung mit allen Rezeptorsubtypen dar (vgl. Abb. 2). Dabei werden von DP3 nur biologisch aktive NPY-Formen gebunden. NPY-Fragmente, die nur aus Teilen des C-Terminus bestehen, werden weder von DP3 (Abb. 19, Eintrag 1-7) noch von einem NPY-Rezeptorsubtyp komplexiert (persönliche Mitteilung A. Beck Sickinger): Dem C-terminalen Konstrukt NPY 18-34 fehlen verglichen zu dem Konstrukt NPY 18-36 die beiden endständigen Aminosäuren R35 und Y36. Das Konstrukt NPY 18-34 zeigt keine Bindung zu DP3 oder zu einem NPY-Rezeptor, während das N-terminal verkürzte NPY Fragment NPY 18-36 ein selektiver Y2-Rezeptor Agonist ($IC_{50}=0,25$ nM) ist. Auch die Affinität von DP3 zu NPY 18-36 ist vergleichbar zu der Affinität von DP3 zu NPY. Dabei ist der vollständige C-Terminus des NPY für die Interaktion mit den Rezeptoren obligat, jedoch nicht hinreichend. Es wird angenommen, daß verschiedene biologisch aktive Konformationen des NPY existieren, die bestimmte NPY-Rezeptorsubtypen selektiv aktivieren können (Beck-Sickinger, 1996).

DP3 und der Y2-Rezeptor zeigen ein vergleichbares Bindungsverhalten an selektiven NPY-Varianten

Eine etablierte Methode zum Studium der selektiven Bindung und Aktivierung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen durch NPY ist die Untersuchung von selektiven Rezeptoragonisten und deren Bindungsverhalten an NPY-Rezeptorsubtypen (vgl. 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5, 1.2.6), (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000). Dabei handelt es sich bei den bislang aus der Literatur bekannten selektiven Agonisten ausschließlich um NPY-Peptidvarianten.

Nachdem gezeigt wurde, daß DP3 einen selektiven Y2-Rezeptor Agonisten (NPY 18-

Diskussion

36) mit hoher Affinität binden kann (vgl. 4.2.8), wurde das Bindungsverhalten von DP3 an weiteren Rezeptorsubtyp-spezifischen NPY-Varianten untersucht.

Die Substitution von Isoleucin durch Leucin an Position 31 des NPY und insbesondere der Austausch des Glutaminrestes an Position 34 gegen die turn-induzierende Aminosäure Prolin führt zu einem spezifischen Y1-Rezeptor-Agonisten (Fuhlendorff, *et al.*, 1990). Eine Interaktion von DP3 mit der Y1-spezifischen NPY [$L^{31}P^{34}$]-Mutante konnte nicht detektiert werden. Auch die Y5-spezifische NPY-Mutante Ala31-Aib32 wird von DP3 nur mit reduzierter Affinität gebunden (vgl. Abb. 19).

Bei dem selektiven Y2-Rezeptor Agonisten NPY [Ahx⁵⁻²⁴] sind 4 N-terminale Aminosäuren über einen Aminohexansäurelinker mit dem C-terminalem NPY-Fragment NPY 25-36 verknüpft. Während das isolierte C-terminale Fragment NPY 25-36 weder biologisch aktiv ist noch von DP3 gebunden wird, ist die zentral deletierte NPY-Variante sowohl ein selektiver Y2-Rezeptor Agonist (Y2=IC₅₀ 2nM, Y1=IC₅₀>4 µM, Y5=IC₅₀795 nM) als auch ein Bindungspartner von DP3 (Beck, *et al.*, 1989). Es wird diskutiert, daß die biologisch aktive NPY-Konformation, welche selektiv vom Y2-Rezeptor gebunden wird, eine Hairpin-ähnliche Struktur ausbildet, wobei N- und C-Terminus räumlich eng beieinander liegen (vgl. Abb. 2). Dabei repräsentiert der C-Terminus die funktionelle Region (Bindungsregion), wobei die N-terminale Region die strukturelle Komponente darstellt, welche die richtige Orientierung des C-Terminus stabilisiert (Cabrele und Beck-Sickinger, 2000).

Aus den Bindungsstudien mit den NPY-Varianten, spezifisch für einzelne Rezeptorsubtypen, geht hervor, daß DP3 durch ein dem Y2-Rezeptorsubtyp ähnliches selektives Bindungsverhalten an NPY charakterisiert ist (vgl. Tab. 12).

Diskussion

NPY-Variante	Y1-Rezeptor	Y2-Rezeptor	Y5-Rezeptor	Aptamer-DP3
NPY	++	++	++	++
NPY 18-34	-	-	-	-
NPY 13-36	-	++	-	++
NPY 18-36	-	++	-	++
NPY [Ahx⁵⁻²⁴]	-	++	-	++
NPY [L³¹P³⁴]	++	-	++	-
NPY [A³¹, Aib³²]	-	-	++	+

Tabelle 12 Bindungsverhalten von NPY und NPY-Varianten an den Y1-, Y2- und Y5-Rezeptor und das Aptamer DP3 im Vergleich.

Bindungsaffinitäten: ++ Affinität von den NPY-Rezeptorsubtypen oder von DP3 zu einer NPY-Variante ist vergleichbar zur Affinität zum NPY; + die Affinität ist um 50% reduziert im Vergleich zum NPY; - keine Bindung ist detektierbar

Mutanten: NPY 13-36: und NPY 18-36: N-terminal verkürzte NPY-Varianten, NPY 18-34: N- und C-terminal verkürzte NPY-Variante, NPY [Ahx⁵⁻²⁴]: Substitution der zentralen Aminosäuren 5-24 durch einen Aminohexansäurelinker, NPY [L³¹P³⁴]: Substitution der Aminosäuren an Position 31 von Isoleucin zu Leucin und an Position 34 von Glutamin zu Prolin, NPY [A³¹, Aib³²]: Substitution der Aminosäuren an Position 31 von Isoleucin zu Alanin und an Position 32 von Tyrosin zur Aminoisobuttersäure.

Die Bindungsaffinitäten für NPY und für die NPY-Varianten an die einzelnen NPY-Rezeptoren sind der Veröffentlichung Cabrele & Beck-Sickinger (2000) entnommen (vgl. Tab. 2).

Die selektive Konkurrenz der Bindung von NPY an den Y1-, Y2- und Y5-Rezeptor durch DP3

Infolge des selektiven *in vitro*-Bindungsverhaltens von DP3 an NPY-Varianten vergleichbar zum Y2-Rezeptor stellt sich die Frage: Wird das Bindungsverhalten von

Diskussion

NPY an seine verschiedenen NPY-Rezeptorsubtypen (Y1, Y2 und Y5) im Zellkulturmodell durch DP3 differentiell moduliert ?

In den im Zellkulturmodell durchgeführten Wettbewerbsstudien zwischen Aptamer, NPY und NPY-Rezeptorsubtyp konnte für den Y2-Rezeptor der niedrigste K_i -Wert für DP3 ermittelt werden ($K_i:Y2 = 1,3 \pm 0,5$). Die Wettbewerbsstudie von NPY am Y1- und Y5-Rezeptor durch DP3 war im Vergleich zur Wettbewerbsstudie am Y2-Rezeptor um den Faktor 40 (Y1) bis 200 (Y5) niedriger ($K_i:Y1 = 50 \pm 21$, $K_i:Y5 = 262 \pm 40$). Die unselektierte Pool-RNA zeigte bei keinem Rezeptorsubtyp eine Inhibition der NPY-Bindung (vgl. 4.2.10).

Nicht nur die Inhibitionskonstante von DP3 in Gegenwart des Y2-Rezeptors, auch der Kurvenverlauf in Gegenwart des Y2-Rezeptor unterscheidet sich von der Wettbewerbsstudie am Y1- und Y5-Rezeptor. Während für den Y1- und Y5-Rezeptor ein biphasischer Kurvenverlauf charakteristisch ist, zeigt sich am Y2-Rezeptor ein monophasischer Kurvenverlauf. Für den Y1- und Y5-Rezeptor konnte zwar bereits bei niedrigen Konzentrationen (1 –5 nM) eine Inhibition der Bindung des NPY an den Rezeptor durch DP3 gezeigt werden (vgl. Abb. 20): Diese initial sehr affine NPY-Bindung durch DP3 führt bei Erhöhung der Aptamer-Konzentration zu keiner wesentlichen Steigerung der Inhibition der NPY-NPY-Rezeptorwechselwirkung. Erst bei einer DP3-Konzentration von 50-100 nM nimmt die Inhibition der NPY-Rezeptorbindung wieder deutlich zu. Ein derartiger biphasischer Kurvenverlauf läßt ein auf zwei Bindungsstellen beruhendes Rezeptorbindungsmodell vermuten.

Für den Y2-Rezeptor hingegen zeigt sich ein monophasischer Kurvenverlauf, der modellhaft einem auf einer Bindungsstelle beruhenden Rezeptorbindungsmodell entspricht. Bei dem Wettbewerbsversuch am Y2-Rezeptor fehlt das initiale hochaffine Bindungsverhalten des Aptamers am NPY, welches am Y1- und Y5-Rezeptor den DP3-Konzentrationsbereich von 1-5 nM charakterisiert.

Dies legt die Vermutung nahe, daß NPY in verschiedenen Konformationen vorliegt, die bestimmte Rezeptorsubtypen differentiell aktivieren. Das Aptamer DP3 bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an die verschiedenen Konformationen des NPY. So stellt vermutlich die NPY-Konformation, die den Y2 Rezeptor aktiviert, eine von DP3 mit relativ hoher Affinität gebundene Konformation dar. Für die Rezeptoren Y1 und

Diskussion

Y5 können dagegen zwei aktive NPY Konformationen postuliert werden, eine von DP3 hochaffin und eine zweite von DP3 sehr niedrig affin gebundene NPY-Konformation.

Im Vergleich zeigt sich die insgesamt stärkste Inhibition des Aptamers DP3 am Y2-Rezeptor bzw. die stärkste Interaktion des Aptamers mit der den Y2-Rezeptor aktivierenden NPY-Konformation. Ob diese unterschiedlichen Konformationen vom Y2-Rezeptor induziert und dann präferentiell vom Aptamer erkannt werden oder vom Aptamer selber induziert und/oder stabilisiert werden, kann nicht geklärt werden. Letztendlich kann aufgrund der Kompetitionsstudien allein nicht ausgeschlossen werden, daß die unterschiedliche Inhibition des Aptamers in der Bindung des NPY an seine Rezeptoren ausschließlich auf unterschiedliche NPY-Konformationen und nicht auf stukturelle Charakteristika der Rezeptorsubtypen selbst im Sinne einer "Niedrig und hoch affinen Bindungsstelle" zurückzuführen ist.

Aus den Resultaten der Rezeptorbindungsstudien zusammen mit den Ergebnissen der Versuche mit trunkierten und mutierten NPY-Varianten wird klar, daß DP3 ein spezifischer NPY-Ligand, mit mimetischen Y2-Rezeptoreigenschaften ist. Damit konnte erstmals mit Hilfe eines selektiven NPY-Nukleinsäureliganden bestätigt werden, daß das Neuropeptid Y in unterschiedlichen biologisch aktiven Konformationen *in vivo* vorliegen kann, wobei sich die Y2-Rezeptor spezifische NPY-Konformation von der Konformation unterscheidet, welche den Y1- bzw. Y5-Rezeptor aktivieren kann.

Arginin33 des NPY ist essentiell für die Aptamer Bindung

Im Rahmen von Feinmappingexperimenten zur Charakterisierung der minimalen Aptamer-Bindungsstelle an NPY wurden vier positiv geladene Argininreste im C-terminalem Bereich durch Alanin substituiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Argininrest an Position 33 essentiell für die DP3-NPY-Komplexbildung ist. Eine Substitution durch Alanin führt zum vollständigen Verlust der Aptamerbindung.

Diskussion

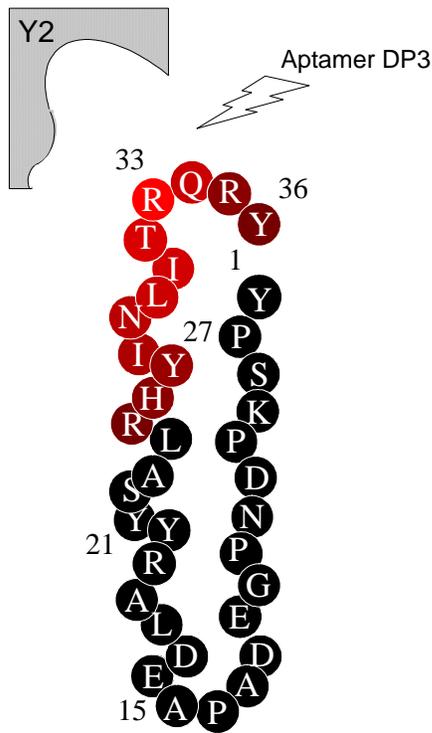


Abbildung 38 Modellvorstellung zur biologisch aktiven NPY-Konformation am Y2-Rezeptor, die durch das Aptamer kompetitiert wird: Die C-terminale Bindungsregion für das Aptamer DP3 an NPY ist rot (rot: für Bindung essentiell) hervorgehoben, wobei durch die farbliche Abstufung die entsprechende Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Komplexbildung von DP3 und NPY dargestellt ist (schwarz: nicht an der Bindung beteiligte AS).

Eine Reihe von viralen Proteinen (z. B. HIV-Rev, HIV-TAT) enthalten argininreiche Epitope, welche die Bindungsregion für die natürlichen Nukleinsäureliganden repräsentieren. Durch Strukturanalyse der RNA-Peptid-Komplexe mittels NMR-Spektroskopie ist es gelungen, die molekularen Wechselwirkungen zwischen den Argininresten der Peptide und den RNA-Aptameren aufzuklären und ein typisches Argininbindungsmotiv zu definieren. Dabei liegen die Peptide in der "großen Furche" der RNA. Spezifische Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrücken zwischen den Guaninresten der RNA und Guanidiniumgruppen der Argininseitenketten der Peptide stabilisieren den Komplex. In vielen Fällen erfordert die Ligandbindung eine Erweiterung der "großen Furche" der RNA Helix, die beispielsweise durch Purin-Purin-Basenpaare erreicht wird. Die RNA-Aptamere, welche unstrukturiert in Lösung vorliegen, sind in Gegenwart des Peptides durch eine definierte Architektur gekennzeichnet (Hermann und Patel, 2000).

Für den HIV-1Rev Komplex wurde beispielsweise durch NMR-Analyse gezeigt, daß auch die Struktur des Peptides in Abhängigkeit von dem Nukleinsäureliganden nach

Diskussion

der RNA-Bindung verändert wird. So nimmt das HIV-1 REV-Peptid nach Bindung eines Rev-Aptamers (Sequenzfamilie I) eine α -helikale Konformation ein, während das gleiche Peptid im Komplex mit einem anderen Rev-Aptamer (Sequenzfamilie II) eine entfaltete Struktur einnimmt. Für das MS2 Coat-Protein konnte durch Röntgenkristallstrukturanalyse gezeigt werden, daß das Protein trotz Bindung einer natürlichen viralen RNA oder Aptamer-RNA keine konformationellen Unterschiede im Vergleich zum frei vorliegenden MS2 Coat-Protein aufweist. Bei diesem Beispiel ändert sich durch einen "*induced fit*" Mechanismus nur die Struktur der RNA (Valegard *et al.*, 1990), (Convery, *et al.*, 1998).

Um qualitative Informationen bzgl. der Änderung der Sekundärstruktur von Aptamer DP3 und NPY nach Komplexbildung zu erhalten, wurden erste CD-spektroskopische Analysen durchgeführt.

Dabei konnte im nahen UV-Bereich (240-265 nm), welcher vor allem die Veränderung der molekularen Umgebung der Aromaten widerspiegelt, eine definierte Sekundärstrukturveränderung der selektierten RNA durch spezifische Interaktion mit dem NPY beobachtet werden. Das Neuropeptid Y weist im fernen UV-Bereich (200-240 nm) eine α -helikale Sekundärstruktur auf. Nach Bindung von DP3 kann im Gegensatz zum Kontrollansatz mit nichtbindender RNA eine deutliche Zunahme des α -helikalen Anteils beobachtet werden. Eine Aussage zur Veränderung der Konformation von NPY nach Zugabe des Aptamers DP3 ist aufgrund überlagernder Spektren der einzelnen Komponenten in diesem Wellenlängenbereich derzeit noch nicht möglich (Daten Höfliger nicht gezeigt).

Anwendungsmöglichkeiten der NPY-Aptamere

Die differentielle Interaktion von DP3 mit Rezeptorsubtyp-spezifischen Konformationen des NPY ermöglicht die Anwendung des Aptamers zur Charakterisierung der Interaktionstopologie der NPY-NPY-Rezeptorinteraktion auf molekularer Ebene.

Die von Grouzmann *et al.* beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen verschiedene NPY-Epitope können zwischen NPY und den anderen Mitgliedern der pankreatischen Polypeptidfamilie mit einer Affinität von $3,8 \times 10^{-8}$ M bis $2,5 \times 10^{-10}$ M

Diskussion

diskriminieren (Grouzmann *et al.*, 1992). Eine Selektivität dieser Antikörper gegenüber distinkten, biologisch aktiven NPY-Konformationen wurde bisher nicht beschrieben. Zudem haben Antikörper aufgrund ihrer Größe den Nachteil möglicher sterischer Effekte auf die Ligand-Rezeptor-Interaktion. Die von uns selektierten Aptamere zeigen zwar eine geringere Affinität zum NPY, können jedoch ein erheblich differenzierteres Werkzeug zum Studium der Rezeptoraktivierung sein. Diese kann beispielsweise in *in vivo* Studien oder in Experimenten an Hirnschnitten genutzt werden: In Hirnbereichen, wo mehrere NPY-Rezeptorsubtypen exprimiert werden, könnte durch selektive Inhibition des Y2-Rezeptorsubtyps durch DP3 dessen Bedeutung im Kontext mit der Funktion der anderen Rezeptoren besser verstanden werden.

Um DP3 als Detektionsmodul für wissenschaftliche aber auch diagnostische Applikationen zu verwenden, sind neben dem radioaktivem Labeling der Aptamere alternative Markierungsstrategien notwendig. Eine Fluoreszenzmarkierung (z.B. Fluorescein) am 5'-Ende von DP3 über eine Guanosin-5'-phosphorthioat-Gruppe (vgl. 3.3.14, (Burgin und Pace, 1990)) führte in den *in vitro* Bindungsanalysen zu keiner Einschränkung des Bindungsverhaltens an NPY (Daten nicht gezeigt). Demzufolge sollte der Fluoreszenzfarbstoff an dieser Position die funktionelle Konformation des Aptamers nicht beeinflussen. Auch eine sterische Kompetition der Bindung von DP3 an NPY durch den Fluoreszenzfarbstoff ist nicht wahrscheinlich.

Weiterhin konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß sich DP3 innerhalb der pankreatischen Polypeptidfamilie durch eine hohe Spezifität auszeichnet. Obwohl das humane Pankreatische Polypeptid (hPP) eine 50%ige Sequenzhomologie zum NPY aufweist, wurde es von DP3 nicht komplexiert. Diese Sequenzspezifität ist im Hinblick auf eine diagnostische Anwendung der Aptamere sowohl bei immunhistochemischen Analysen als auch zur Quantifizierung von NPY, welches bei endokrinen Tumoren, z. B. beim Phäochromocytom (Grouzmann *et al.*, 1994), (Grouzmann *et al.*, 1998) in erhöhter Konzentration im Plasma gefunden wird, denkbar. Von Drolet und Mitarbeitern wurden bereits fluoreszierende Aptamere eingesetzt, um Proteinkonzentrationen in einem ELISA-ähnlichen Assay (ELONA, *enzyme linked oligonukleotid assay*) zu quantifizieren (Drolet, *et al.*, 1996).

Diskussion

Aufgrund der hohen Spezifität und Stabilität des Aptamers DP3 ist eine Aufreinigung von natürlichem NPY aus verschiedenen biologischen Materialien durch einen affinitätschromatographischen Prozess denkbar. Dabei könnten die RNA-Moleküle am 5'-Ende über eine Thiophosphatgruppe biotinyliert und so an Streptavidinsäulen als Aptamer-Affinitätsmatrix gekoppelt werden.

Im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung des Aptamers DP3 zur Inhibition von Y2-vermittelten Effekten muß die Stabilität der Aptamere im Organismus, die Toxizität, die Immunogenität und weitere komplexe Fragen, wie beispielsweise die Passage über die Blut-Hirn-Schranke, geklärt sein.

Die mit Hilfe von NPY spezifischen Aptameren generierten Informationen sind wichtige Voraussetzung zur weiteren Validierung des Zielmoleküls NPY und damit für die Entwicklung von selektiven Y2-Rezeptor Agonisten bzw. Antagonisten und deren Einsatz als potentielle Therapeutika.

5.2 Die Prionprotein-spezifischen Aptamere

Infolge des Ausbruchs der BSE-Epidemie in Großbritannien und der damit verbundenen Gefahr der Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen stieg das Interesse an spezifischen Diagnostika. Da zu diesem Zeitpunkt (im Jahr 1996) noch keine Antikörper existierten, die zwischen der zellulären und pathogenen Isoform des Prionproteins unterscheiden konnten, sollten mit Hilfe der SELEX-Technologie Prionprotein-spezifische Nukleinsäureliganden generiert werden (Weiss, *et al.*, 1997). Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der selektierten RNA-Aptamere.

G-Quartette als Sekundärstrukturmotiv

Die Analyse der Primärstruktur der generierten Aptamersequenzen ergab, daß sich 70% durch vier repetitiv auftretende Guanosintripletts auszeichnen, was die Ausbildung einer G-Quartettstruktur als Sekundärstrukturmotiv der RNA vermuten lässt (vgl. Abb. 39). Die einzelnen Sequenzmotive unterscheiden sich nur in der Stem- und Loopregion (vgl. Abb. 21). Gellert postulierte bereits 1962, daß die planare Anordnung von vier Guanosinresten stabilisiert durch Hoogsteen-Basenpaare zur Ausbildung von G-Quartetten führt, welche wiederum in Gegenwart einwertiger Kationen inter- oder intramolekulare, komplexe Tetraplexstrukturen formieren können (Gellert, 1962), (Wang und Patel, 1992). Auch die Telomer-DNA eukaryontischer Zellen ist durch intramolekulare Tetraplexstrukturen charakterisiert (Sundquist und Klug, 1989), (Murchie und Lilley, 1994).

Für das Riboflavin-RNA-Aptamer und für das Immunglobulin E-Aptamer wurde bereits ein G-Quartett als stabilisierendes Sekundärstrukturmotiv nachgewiesen (Wiegand *et al.*, 1996), (Lauhon, 1995).

Die beobachtete, erhöhte Stabilität des PrP-Aptamers Ap1 im Vergleich zur unselektierten Pool-RNA in Gegenwart von 10% FKS ist ein weiterer Hinweis für die Stabilisierung der selektierten Sequenzen durch G-Quartette (Daten nicht gezeigt).

Die Substitution der Guanosinreste durch Uridinreste wie auch die Konstruktion der Antisense-Variante des Aptamers Ap1 führt zum vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit der Aptamere (vgl. Abb. 23 und 27). Zum einen ist durch derartige

Diskussion

Mutationen die Ausbildung einer postulierten G-Quartettstruktur nicht mehr möglich, zum anderen kann der Bindungsverlust bei Ausbildung einer anderen Sekundärstruktur auch auf die Veränderung der Nukleotidbausteine des Aptamers, welche direkt an der Interaktion mit dem PrP beteiligt sind, zurückzuführen sein.

Eine Möglichkeit zum Nachweis von G-Quartettstrukturen wäre der selektive Verdau mit RNase T1, welche nach unstrukturierten Guanosinresten spezifisch spaltet (Lin, *et al.*, 1996). Darüber hinaus könnte durch die Verwendung von 7-deazaguanin-Nukleotiden, bei welchen durch die Substitution des Stickstoffs an Position sieben im Purinring durch Kohlenstoff die Wasserstoffbrückenbildung zu einem anderen Guanosinrest im G-Quartett verhindert wird, die Ausbildung von G-Quartetten weiter belegt werden (Murchie und Lilley, 1994).

Der N-Terminus des Prionproteins ist die Aptamerbindungsregion

Durch native Gelshiftanalyse konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Hamsterprionprotein der vollen Länge (GST::PrP23-231) nur von den repräsentativen Sequenzmotiven, die aufgrund ihrer Primärstruktur ein G-Quartett ausbilden können, spezifisch gebunden wird. Eine Interaktion mit dem Fusionsprotein GST oder dem N-terminal verkürzten rekombinanten Prionprotein des Hamsters (GST::PrP90-231) konnte für kein Sequenzmotiv beobachtet werden (vgl. Abb. 21). Dies läßt vermuten, daß das N-terminale Epitop des PrP's an der Bindung des Aptamers beteiligt ist.

Zur Identifizierung der PrP-Bindungsdomäne der Aptamere wurden sechs an GST fusionierte PrP-Fragmente in *E.coli* synthetisiert und in einem Gelshiftexperiment untersucht (vgl. Abb. 24). Dabei konnte nur für das N-terminale Fragment des Prionproteins (AS 32-52) eine Komplexbildung mit Ap1 nachgewiesen werden. Diese definierte Interaktion kann zum einen darauf zurückzuführen sein, daß gerade der N-terminale Bereich (AS 23-127) des Prionproteins, wie durch NMR-Strukturanalyse gezeigt werden konnte, eine sehr flexible, unstrukturierte und zugängliche Proteindomäne darstellt (Donne, *et al.*, 1997). Zum anderen setzt sich der N-Terminus im Vergleich zum restlichen Protein vor allem aus basischen, positiv geladenen Aminosäuren zusammen, die infolge ionischer Wechselwirkungen die

Diskussion

polyanionischen RNA-Moleküle bevorzugt anziehen.

Aptamere binden authentisches Prionprotein verschiedener Spezies

Vor dem Hintergrund einer möglichen diagnostischen Anwendung der selektierten Aptamere wurde untersucht, ob diese zelluläres Prionprotein aus isolierten Gehirnhomogenaten spezifisch binden können. Dabei konnte für die Gehirnhomogenate von Hamster, Maus und Rind ein definiertes Komplexbildungssignal nachgewiesen werden (vgl. Abb. 25).

Die Tatsache, daß bei der Analyse von Gehirnhomogenaten der PrP-knock-out-Maus (PrP^{0/0}) kein Bindungssignal detektierbar war, ist Hinweis für eine spezifische Interaktion des Aptamers mit authentischem PrP. Der eindeutige Spezifitätsbeweis für die Aptamer-PrP-Interaktion gelingt durch das Supershiftexperiment in Gegenwart PrP-spezifischer Antikörper. Dabei ist für den Aptamer-PrP-Antikörperkomplex im Vergleich zum Aptamer-PrP-Komplex ein verzögertes Laufverhalten nachweisbar (vgl. Abb. 26).

Der N-terminale Sequenzbereich des Prionproteins ist zwischen Maus, Hamster und Rind hoch konserviert, wobei im Falle des Rinderprionproteins ein zusätzlicher Glycinrest zwischen Position 28 und 29 im Vergleich zur Maus oder zum Hamster inseriert ist. Hamsterprionprotein und Mausprionprotein sind in dieser Region sequenz-identisch (Schatzl, *et al.*, 1995). Eine Speziespezifität innerhalb der untersuchten Hirnhomogenate konnte entsprechend der Homologie der Prionproteine für die N-terminal-bindenden Aptamere nicht festgestellt werden.

Differentielle Bindung der Aptamere an PrP^{Sc} oder PrP^C?

Nachdem gezeigt wurde, daß die *in vitro* selektierten Aptamere sowohl rekombinantes Hamsterprionprotein der vollen Länge (GST::PrP23-231), als auch endogenes Prionprotein aus komplexen Proteingemischen (wie Hirnhomogenaten) spezifisch binden können, sollte untersucht werden, ob eine der beiden Prionproteinisoformen (PrP^C oder PrP^{Sc}) präferentiell von den Aptameren komplexiert wird. In Gelshiftexperimenten mit Gehirnhomogenaten aus Scrapie-infizierten Mäusen ist im Vergleich zu nicht infizierten Maushirnhomogenaten ein

Diskussion

deutlich abgeschwächtes Signal detektierbar (vgl. Abb. 28 A). Dies könnte auf die Bindung des Aptamers an zelluläres, noch unkonvertiertes PrP (PrP^{C}), welches in infizierten Tieren neben der pathogenen Isoform PrP^{Sc} nachgewiesen werden kann, zurückzuführen sein. Entsprechend dieser Annahme wird aufgrund der geringeren Konzentration an PrP^{C} in infizierten Mausgehirnen im Vergleich zu Wildtyp-Mausgehirnen die Interaktion mit der Aptamer RNA abgeschwächt.

Durch Behandlung mit Proteinase K lassen sich die beiden Isoformen PrP^{C} und PrP^{Sc} experimentell unterscheiden. Während PrP^{C} durch Proteinase K (PK) vollständig degradiert wird, führt der PK-Verdau von PrP^{Sc} zur Abspaltung des N-Terminus (AS 23-90). Eine PK-Vorbehandlung der hier verwendeten Gehirnhomogenate von infizierten und nicht infizierten Mäusen führt in der darauffolgenden Bindungsstudie für beide Isoformen des Prionproteins zum Verlust der Komplexbildung mit dem Aptamer (vgl. Abb. 28 A). Damit lässt sich für diese Untersuchung keine Spezifität der Aptamere gegenüber PrP^{C} ableiten, da genau die Bindungsregion des Aptamers an PrP, der N-Terminus, nach PK-Behandlung auch im Falle der infektiösen Isoform (PrP^{Sc}) degradiert wird.

Inzwischen ließe sich dieser Sachverhalt durch die Verwendung des PrP^{Sc} -spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAK) 15B3 *in vitro* untersuchen. Dieser mAK wurde von B. Oesch und Mitarbeitern durch Immunisierung von PrP-knock-out-Mäusen mit rekombinantem Prionprotein des Rindes hergestellt und zeigt eine selektive Bindung von PrP^{Sc} unter physiologischen Bedingungen (Korth *et al.*, 1997). Da die Bindungsregion von 15B3 an PrP^{Sc} nicht im N-terminalen Bereich liegt und damit nicht kompetitiv zur Aptamerbindungsstelle ist, wäre eine spezifische Immunpräzipitation von PrP^{Sc} mittels des mAK 15B3 und eine anschließende Bindungsuntersuchung mit markiertem Aptamer denkbar.

Aptamere als BSE-Diagnostika?

Eine diagnostische Anwendung dieser Prionprotein-spezifischen Aptamere ist aufgrund folgender Erkenntnisse fraglich: Zum einen binden die Aptamere mit hoher Spezifität an zelluläres PrP. Zum anderen stellt der PK-sensitive, N-terminale Bereich die Interaktionsdomäne zwischen Aptamer und PrP dar. Es wäre demzufolge nicht

Diskussion

möglich, nach einer PK-Behandlung, welche PrP^C quantitativ degradiert, eine klassische Westernblotanalyse oder Immunpräzipitation mit anschließender Detektion des partiell PK-resistenten PrP^{Sc} durch das Aptamer durchzuführen. Die bisherigen BSE-Schnelltests nutzen diese unterschiedlichen biologischen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}. Die Firma *Prionics* beispielsweise behandelt homogenisiertes Gewebe zuerst mit Proteinase K und analysiert dann das PK-resistente Material mit einem PrP spezifischen Antikörper (6H4), welcher keine Selektivität gegenüber einer PrP-Isoform aufweist. Dies bedeutet jedoch nicht, daß jeder Fall von BSE auch diagnostiziert wird. Voraussetzung für ein positives Testergebnis ist, daß sich bereits eine gewisse Menge an hochmolekularen PrP^{Sc} - Aggregaten im Gehirn abgelagert haben. Das ist erst im Endstadium der Erkrankung, bei Rindern frühestens nach 18 Monaten, der Fall (Medizinreport, 2000).

5.3 Die Prionpeptid-spezifischen Aptamere

Prionproteine sind in ihrer Funktion wenig verstanden und es existieren unterschiedliche Hypothesen zur Pathogenese der mit Prionen assoziierten neurodegenerativen Krankheiten. Dabei ist das Krankheitsbild durch die Ablagerung von schwer löslichem PrP^{Sc} unter Ausbildung von polymeren PrP^{Sc}-Molekülen in Form von amyloiden Plaques charakterisiert (Jendroska *et al.*, 1991).

Selektive Inhibitoren der Prionproteinreplikation können zum einen als TSE Therapeutika eingesetzt werden, zum anderen kann deren Anwendung dazu beitragen, den Mechanismus der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}, die Amyloidakkumulation sowie die Funktion von PrP^{Sc} bei der Replikation des Erregers besser zu verstehen. Nach unserer Arbeitshypothese könnten auch Aptamere gegen funktionelle Bereiche des Prionproteins potentiell die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} und/oder die Akkumulation von PrP^{Sc}-Molekülen beeinflussen.

Das Prinzip einer Peptidselektion, wie in dieser Arbeit zur Selektion von Aptameren gegen einen ausgewählten Bereich des Prionproteins praktiziert, wurde bereits von Ellington *et al.* genutzt, um Aptamere gegen ein argininreiches Epitop (ARM) des humanen HIV I Rev-Proteins zu isolieren. Die anti-Peptid-Aptamere erkennen durch die *in vitro* Selektion ihr vorgegebenes Zielmolekül (ARM) im Gesamtproteinkontext mit hoher Spezifität (Xu und Ellington, 1996).

Eine Selektion am Prionprotein der vollen Länge, wie in der vorangegangenen Selektionsstudie gezeigt, führt zu N-terminal bindenden Aptameren, da der basische, flexible N-Terminus des Prionproteins eine "aptamerogene" (aptameranziehende) Interaktionsdomäne darstellt (vgl. Kapitel 5.2). Mit der Eingrenzung des Selektionstargets auf einen im Gesamtproteinkontext strukturell zugänglichen Teilbereich des Prionproteins sollten Aptamere generiert werden, die nicht den N-Terminus des Prionproteins erkennen, sondern einen funktionell wichtigen Teilbereich des Prionproteins komplexieren.

Bei der Auswahl des Selektionstargets (Prionproteinepitop) wurde ein Teilbereich (AS 90-129) herangezogen, für den eine Bedeutung in der Prionproteinreplikation und damit in der Pathogenese der Prionerkrankungen diskutiert wird (Chabry *et al.*, 1998), (Hölscher *et al.*, 1998), (Supattapone *et al.*, 1999), (Peretz *et al.*, 1997), (vgl.

Diskussion

Kapitel 4.4).

Die Prionpeptid-Aptamere binden ihr Zielmolekül im Gesamtproteinkontext

Durch einen affinitätschromatographischen Prozess wurden 2'Amino-2'desoxy-stabilisierte Aptamere gegen die Prionproteinregion AS 90-129 *in vitro* selektiert (vgl. 4.4). Nach Abschluß der Peptidselektion (Zyklus 12) erlaubte die Primärstrukturanalyse der angereicherten RNA-Bibliothek die Einteilung der individuellen Aptamerklone in drei Sequenzfamilien, wobei Familie I mit 77% im Vergleich zur Familie II mit 14% und Familie III mit 7% den größten Anteil der erhaltenen individuellen Aptamerklone darstellt (vgl. Abb. 32). Mit insgesamt 58% der analysierten Klone überwiegt die individuelle Sequenz #7 der Familie I. In einer Bindungsstudie konnte gezeigt werden, daß repräsentative Sequenzen der anti-Peptidaptamere das rekombinante Hamsterprionprotein der vollen Länge mit unterschiedlichen Affinitäten binden können (vgl. Tab. 10). Dabei zeichnet sich das Aptamer #7 (Motiv I) mit einem Kd-Wert von 1,3 µM durch die beste PrP-Affinität aus. Die Prionpeptidselektion ist damit ein weiteres Beispiel dafür, daß die Selektion von Aptameren gegen eine ausgewählte Region eines Proteins, ähnlich zu einem Antikörper, welcher durch Immunisierung mit dem entsprechenden Epitop eines Antigens *in vivo* selektiert wird und dieses im Gesamtproteinkontext binden kann, möglich ist.

Die Prionpeptid-Aptamere inhibieren die Akkumulation von PrP^{Sc} zu hochmolekularen Aggregaten

Der potentielle Einfluß des Prionprotein-spezifischen Aptamers #7 auf den Mechanismus der PrP^{Sc}-Entstehung sollte in persistent Prion-infizierten Neuroblastomzellen (ScN₂a, MHM₂) untersucht werden. Diese Zellen exprimieren zusätzlich zum endogenen Maus-PrP ein chimäres Maus-Hamster-Maus-Konstrukt. Das Hamsterepitop (AS 94-131) umfasst fast vollständig die Bindungsregion (AS 90-129) für die Aptamer RNA (vgl. 4.4.3).

Sowohl die partielle Resistenz von PrP^{Sc} gegenüber Proteinase K (PK) als auch die Unlöslichkeit in nichtionischen Detergentien sind wichtige Unterscheidungskriterien

Diskussion

im Vergleich zu PrP^C (vgl. Tab. 4). Die PK-Resistenz korreliert wiederum mit der Menge an hochmolekularen und infektiösen PrP^{Sc}Aggregaten.

Dabei konnte im Zellkultursystem gezeigt werden, daß das Aptamer #7 den relativen Anteil an *de novo* synthetisiertem, PK-resistentem PrP^{Sc} (PrP^{res}) im Vergleich zur Pool-RNA bzw. dem PBS-Kontrollansatz statistisch signifikant reduziert (vgl. Abb. 37). Dagegen konnte kein Effekt des Aptamers #7 auf die Biosynthese, d.h. auf die Gesamtmenge von *de novo* synthetisiertem, unlöslichem PrP^{Sc} detektiert werden (vgl. Abb. 36, Tab. 11).

Prionpeptid-Aptamere im Licht der verschiedenen Prionproteinypothesen

Einer kinetischen Betrachtung zufolge beinhaltet, entsprechend dem Heterodimermodell, der initiale Schritt des Konversionsprozesses die Bindung von PrP^C an PrP^{Sc} verbunden mit einer Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} (vgl. Einleitung). Mit der darauffolgenden Aggregatbildung entsteht die Proteaseresistenz des neuentstandenen PrP^{Sc} Komplexes (DeArmond und Prusiner, 1993). Für die selektierten Aptamere konnte kein meßbarer Effekt auf die Biogenese von PrP^{Sc} in Analogie zum Heterodimermodell und damit auf die direkte Interaktion zwischen PrP^C und PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Wir postulieren entsprechend unserer experimentellen Beobachtungen eine inhibierende Wirkung des Aptamers auf die Polymerisation von PrP^{Sc}-Molekülen zu hochmolekularen Aggregaten, welche sich in der reduzierten PK-Resistenz des PrP^{Sc}-Materials widerspiegelt. Dabei ist denkbar, daß entweder die Anlagerung von PrP^{Sc}-Molekülen an den Kristallisationskeim in Gegenwart der Aptamere behindert wird oder die quartärnere β -Faltblatt Struktur des PrP^{Sc}-Aggregates von den Aptameren so verändert wird, daß ein Abbau durch Proteinase K begünstigt ist (vgl. Abb. 39).

Für die Inhibition der Akkumulation von PrP^{res} durch Prionpeptid-Aptamere wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: PrP^C liegt GPI-verankert an der Zelloberfläche von Neuroblastomzellen vor, durch Zugabe der Aptamere ins Zellmedium können diese an PrP^C binden. PrP^C wird durch einen endozytotischen Vorgang in Caveolae-ähnliche Kompartimente (*Caveolae Like Domains=CLD*)

Diskussion

transportiert und kann dort in PrP^{Sc} konvertiert werden (Taraboulos *et al.*, 1995). CLD's sind Regionen der Plasmamembran, angereichert mit Cholesterin und Glykospingolipiden und Zielorgane für GPI-verankerte Proteine (Prusiner, 1999). Wir postulieren, daß die Aptamer RNA #7 vermutlich im Komplex mit PrP^C in die Zelle internalisiert wird und dort die Bildung von hochmolekularen PrP^{Sc}-Aggregaten beeinflussen kann. Durch spezifisch Bindung der Aptamere an den von Caughey beschriebenen Kristallisationskeim (vgl. Abb. 6, 39) kommt es zur Konkurrenz mit endogenen Glykosaminoglykanen, die ihrerseits die Bildung von hochmolekularen PK-resistenten Aggregaten begünstigen. Dieser Prozess wird von Aptameren kompetitiv inhibiert. Die endogenen Glykosaminoglykane sind Voraussetzung für die PrP-Amyloid-Bildung in natürlichen TSE und Scrapie-infizierten Mäusen (Snow *et al.*, 1990). Die hier verwendeten Aptamere weisen aufgrund ihrer 2'-Amino 2'-deoxy modifizierten Ribosebausteinen strukturelle Verwandtschaften zu endogenen Glykosaminoglykanen auf.

Wie wir mit unseren Kontrollexperimenten zeigen konnten, ist der inhibitorische Effekt auf die Aggregationsbildung von PrP^{Sc} spezifisch für das getestete Aptamer #7. Für die unselektierte Pool-RNA konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Die von uns beobachtete Reduktion der Ausbildung von hochmolekularen PrP^{Sc}-Aggregaten durch das Aptamer #7 spricht weder für noch gegen eine der postulierten Prionhypothesen. Während Prusiner mit seinem Modell den Schwerpunkt auf die Entstehung von PrP^{Sc}-Dimere legt, beschreibt das kernabhängige Polymerisationsmodell die Entstehung von PK-resistenten Aggregaten aus einem PrP^{Sc} Kristallisationskeim. Entsprechend können wir unsere Ergebnisse sinnvoller Weise nur innerhalb des Polymerisationsmodells einordnen, die PrP^{Sc} Entstehung, wie im Prusiner-Modell betrachtet, wird durch unsere Ergebnisse nicht illustriert.

Diskussion

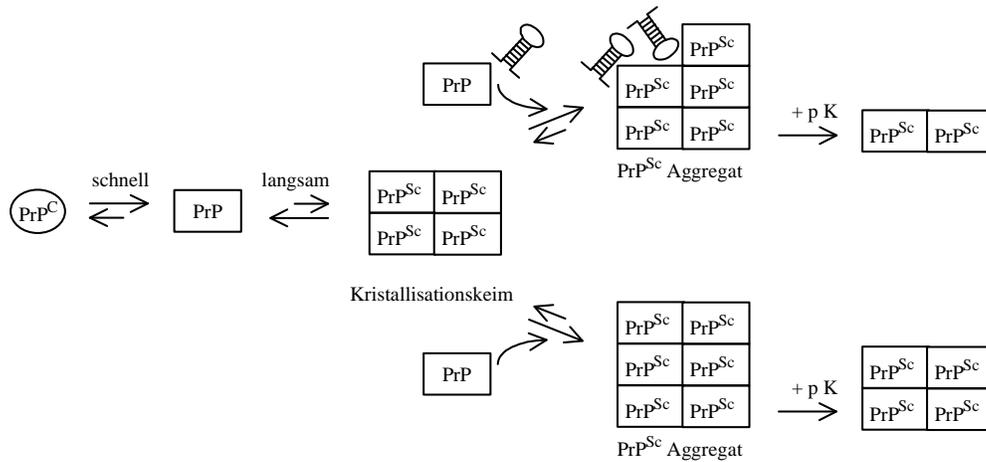


Abbildung 39 *Modifiziertes Modell zur Prionproteinentstehung nach Caughey: Die Ausbildung von hochmolekularen PrP^{Sc}-Aggregaten aus dem Kristallisationskeim wird in Gegenwart der Aptamere beeinflusst. Mit der Aggregatbildung verbunden ist die Aquisition der Proteinase K-Resistenz. In Gegenwart der Aptamere kommt es zur Reduktion der PK-Resistenz als Maß für eine veränderte oder verminderte Aggregatbildung (Caughey et al. 1993).*

Im Verlauf der Pathogenese von spongiformen Enzephalopathien korreliert die PrP^{Sc}-Aggregatbildung (Amyloid) und die damit verbundene Aquisition der Proteinase K-Resistenz mit Infektiosität und Neurodegeneration (Bruce *et al.*, 1989). Für bisher beschriebene potentielle TSE-Therapeutika wie beispielsweise Dextran-Sulfat 500 oder Congo Rot konnte experimentell gezeigt werden, daß sie sowohl in persistent Prion-infizierten Neuroblastomzellen-Zellen die PrP^{Sc}-Akkumulation reduzieren, als auch nach prophylaktischer Behandlung und anschließender Scrapie-Infektion von Mäusen die Überlebenszeit von PrP^{Sc} inokulierten Versuchstieren im Vergleich zu den nicht behandelten infizierten Versuchstieren verlängern (Caughey und Raymond, 1993), (Caughey *et al.*, 1993). Dieser Effekt tritt jedoch nur auf, wenn die Substanzen vor Infektion der Tiere verabreicht wurden (Doh-Ura *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den beschriebenen Substanzen ist das Aptamer #7 im Zellkulturmodell in erheblich geringeren Konzentrationen wirksam (Head und Ironside, 2000).

Bei insgesamt 89 bisher dokumentierten Todesfällen in Europa ist die Prionproteinenerkrankung epidemiologisch betrachtet eine seltene Krankheit. Aufgrund der langen Inkubationszeit der Erkrankung und der Entwicklung der Prionerkrankung

Diskussion

beim Rind, ist die Entwicklung der Krankheitsinzidenz nicht absehbar. Mit der Aufklärung von Pathogenese der Erkrankung wird auch die Herstellung von spezifischen Therapeutika erleichtert.

Mit dieser Arbeit wird ein kleines Mosaikstück im Gesamtbild der Entstehung von Prionerkrankungen eingefügt. Ein zwingender Beweis für eine der beiden postulierten Theorien bleibt aus, auch wenn wir glauben, unsere Ergebnisse am besten in das kernabhängige Polymerisationsmodell einpassen zu können.

6 Zusammenfassung

Die *in vitro* Selektion ermöglicht es aus kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken Oligonukleotidsequenzen zu identifizieren, die verschiedenste Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können. Dadurch haben sich Aptamere zu einer potenten Alternative zu den in der Diagnose, Therapie und als Forschungsreagentien etablierten Antikörper entwickelt.

Mit Hilfe der SELEX-Technologie (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential **E**nrichment) ist es in dieser Arbeit gelungen, 2' amino-stabilisierte RNA-Aptamere gegen das Neuropeptid Y und ein ausgewähltes, funktionell relevantes Prionproteinepitop zu generieren. Die Anreicherung funktioneller Sequenzen erfolgte durch einen affinitätschromatographischen Prozess. Zudem sollten bereits vorliegende RNA-Aptamere, die gegen das rekombinante Prionprotein in früheren Arbeiten selektiert wurden, charakterisiert werden.

Das Neuropeptid Y (NPY), bestehend aus 36 Aminosäuren, gehört zur Familie der pankreatischen Polypeptide und ist bei der Steuerung einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse von Bedeutung. Es wird angenommen, daß durch selektive Bindung unterschiedlicher NPY-Konformationen an die einzelnen G-Protein gekoppelten NPY-Rezeptorsubtypen (Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , Y_5 und Y_6) unterschiedliche Signale vermittelt werden können. Dieses differentielle Bindungsverhalten von NPY an seine Rezeptorsubtypen ist bisher unvollständig verstanden.

Die in dieser Arbeit generierten Anti-NPY-Aptamere binden ihr Zielmolekül -NPY- mit einer Affinität von 370 nM und sind durch eine hohe Spezifität innerhalb der pankreatischen Polypeptidfamilie charakterisiert. Die Bindungsregion des Aptamers an den C-Terminus des Neuropeptid Y wurde durch Kartierungs-Experimente mit NPY-Analoga *in vitro* bestimmt. Die NPY-Analoga stellen sowohl verschiedene Untereinheiten von NPY, als auch Modifikationen des Peptides, die zu Rezeptorsubtypspezifitäten führen, dar. Durch Punktmutationen im C-terminalen NPY-Bereich konnte u.a. gezeigt werden, daß die Aminosäure Arginin an Position 33

Zusammenfassung

für die Komplexbildung von NPY und Aptamer essentiell ist. In den Bindungsstudien in Gegenwart selektiver Agonisten zeigte sich, daß die Bindungseigenschaften von NPY am Y2 Rezeptor weitgehend mit denen an das Aptamer übereinstimmen. Die Kompetition des Aptamers mit den Rezeptoren um $^3\text{H-NPY}$ wurde an Zellen, die die Rezeptoren NPY-Y₁, NPY-Y₂, bzw. NPY-Y₅ exprimieren, untersucht. Das Aptamer verdrängte NPY mit besonders hoher Affinität am Y2 Rezeptor im Vergleich zur Verdrängung am Y1- bzw. Y5-Rezeptor.

Die Anti-NPY-Aptamere weisen ein Bindungsverhalten am NPY vergleichbar zum Y2-Rezeptor auf und stellen damit ein wertvolles Werkzeug zur selektiven Charakterisierung der Interaktion zwischen NPY und seinen Rezeptoren dar.

Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien ist die infektiöse Form des Prionproteins (PrP^{Sc}). Es wird angenommen, daß PrP^{C} durch einen posttranslationalen Prozeß in PrP^{Sc} konvertiert werden kann. Trotz identischer Primärstruktur unterscheiden sich die beiden Prionproteinisoformentypen (PrP^{C} und PrP^{Sc}) grundlegend in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften.

Die in früheren Arbeiten selektierten Prionprotein-Aptamere sollten im Hinblick auf ihr diagnostisches Potential charakterisiert werden. Erste strukturelle Untersuchungen führten zu der Annahme, daß die RNA-Aptamere ein G-Quartett als stabilisierendes Sekundärstrukturmotiv ausbilden können. Sowohl Kartierungsstudien mit unterschiedlichen Prionproteinpeptiden als auch Bindungsstudien mit N-terminal trunkiertem PrP^{Sc} zeigten, daß der N-Terminus für die Bindung der Aptamere essentiell ist. In Gelshiftexperimenten mit verschiedenen Hirnhomogenaten konnte die spezifische Bindung der Aptamere an authentisches PrP gezeigt werden. Aufgrund der fehlenden PrP^{Sc} -Isoformspezifität der untersuchten Aptamere ist eine diagnostische Anwendung kaum denkbar. Die Bindung der Aptamere in der pK-sensitiven, N-terminalen Prionprotein-domäne läßt eine Anwendung in Kombination mit Proteinase K-Verdau in Analogie zu den derzeit benutzten BSE-Testverfahren nicht zu.

Zusammenfassung

Im letzten Teil der Arbeit sollten RNA-Aptamere gegen einen für die Konversion wichtigen Bereich des Prionproteins (AS 90-129) generiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß die in einer vorgeschalteten Prionpeptidselektion (AS 90-129) identifizierten Aptamere in der Lage sind, ihr Zielmolekül im Gesamtkontext des Prionproteins zu erkennen. In funktionellen Studien in persistent Prion-infizierten Neuroblastomzellen wurde eine statistisch signifikante und spezifische Reduktion der Akkumulation von *de novo* synthetisiertem PrP^{Sc} zu hochmolekularen Aggregaten in Gegenwart einer ausgewählten Aptamersequenz beobachtet. Im Verlauf der Pathogenese von spongiformen Enzephalopathien korreliert die PrP^{Sc}-Aggregatbildung mit Infektiosität und Neurodegeneration. Damit bieten die selektierten Aptamere möglicherweise eine Ausgangsbasis um Therapeutika zu entwickeln, die den Verlauf der Prionerkrankungen beeinflussen.

Anhang

7 Anhang

Motiv I

Ap1 CACUGCAGCAAUUCGUUGUGC**GGG**AUUUGA**GGG**ACGAU**GGG**GAAGU**GGG**-ACGAAUGACUCAUUGCCGCGGUAGGGUUAGGCACC
CACUGCAGCAAU**CGUUGUG****GGG**AUUUGA**GGG**ACGAU**GGG**GAAGU**GGG****GAC**GAAUGACUCAUUGCCGCGGUAGGGUU-GGCACC

Motiv II

Ap2 CACUGCUACCUUAGAGUAGGAGC**GGG**ACGAG**GGG**UUUGUU**GGG**ACGU**GGG**UAUGAUCCAUAUAUUAGGAAGCUGGUGAGCUGGCACC
CACUGCUACCUUAGAGUAGGAGC**GGG**ACGAG**GGG**UUUGUU**GGG**ACGU**GGG**UAUGAUCCAUAUAUUAGGAAGCUGGUGAGCUGGCACC
CACUGCUACCUUAGAGUAGGAGC**GGG**ACGAG**GGG**UUUGUU**GGG**ACGU**GGG**UAUGAUCCAUAUAUUAGGAAGCUGGUGAGCUGGCACC

Motiv III

Ap3 CACUGCGACAUG**GGG**AAGAG**GGG**AAGAG**GGG**UUGUC**GGG**AGAUAAUGUCGCGAAACUAAGAACUCUAAGAGCUGCCC-GUGGCACC
CACUGCGACAUG**GGG****GAG****GGG**AAGAG**GGG**UUGUC**GGG**AGAUAAUGUCGCGAAACUAAGAACUCUAAGAGCUGCCC-GUGGCACC
CACUGCGACAUG**GGG**AAGAG**GGG**AAGAG**GGG**UUGUC**GGG**AGAUAAUGUCG**CAAAG**CUAAGAACUCUAAGAGCUGCC**GC**GUGGCACC

Ap15 CACUGCCCUCGAAAACUGUGAAGAGUACGCUUUAACUGUGCUCCGUGUGGAUUGACCAUAGACCCGUGCCUGGACAGGCACC

Abbildung 40 Sequenzen der individuellen Aptamerklone, welche gegen rekombinantes GST-PrP^C 23-231 (Syrischer Goldhamster) durch in vitro Selektion generiert wurden. Die unterschiedliche Primärstrukturen erlauben eine Einteilung in 3 Sequenzfamilien. Die auftretenden Guanosinriplets sind fett hervorgehoben. Mutationen und Deletionen innerhalb einer Sequenzfamilie im Vergleich zur jeweils ersten dargestellten Sequenz sind grau unterlegt. Ap1 (Motiv I), Ap2 (Motiv II), Ap3 (Motiv III) und Ap 15 (kein Motiv) wurden für weitere Charakterisierungen herangezogen.

8 Literaturverzeichnis

Akowitz, A., Sklaviadis, T. und Manuelidis, L. (1994) Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nucleic Acids Res* **22**, 1101-7

Allen, J., Novotny, J., Martin, J. und Heinrich, G. (1987) Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2532-6

Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A. und Clarke, M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-6

Alper, T., Haig, D.A. und Clarke, M.C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 278-84

Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R. und Wells, G.A. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**, 779-88

Andrews, N.J., Farrington, C.P., Cousens, S.N., Smith, P.G., Ward, H., Knight, R.S., Ironside, J.W. und Will, R.G. (2000) Incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **356**, 481-2

Baskerville, S., Zapp, M. und Ellington, A.D. (1995) High-resolution mapping of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex- binding element by in vitro selection. *J Virol* **69**, 7559-69

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. und Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-28

Beck, A., Jung, G., Gaida, W., Koppen, H., Lang, R. und Schnorrenberg, G. (1989) Highly potent and small neuropeptide Y agonist obtained by linking NPY 1-4 via spacer to alpha-helical NPY 25-36. *FEBS Lett* **244**, 119-22

Beck-Sickinger (1996) Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *Elsevier Science DDT* **1**, 502-513

Literaturverzeichnis

- Bell, C., Lynam, E., Landfair, D.J., Janjic, N. und Wiles, M.E.** (1999) Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 533-42
- Bleakman, D., Colmers, W.F., Fournier, A. und Miller, R.J.** (1991) Neuropeptide Y inhibits Ca²⁺ influx into cultured dorsal root ganglion neurones of the rat via a Y2 receptor. *Br J Pharmacol* **103**, 1781-9
- Blind** (2000) Doktorarbeit.
- Blind, M., Kolanus, W. und Famulok, M.** (1999) Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3606-10
- Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. und Toole, J.J.** (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564-6
- Bolton, D.C., McKinley, M.P. und Prusiner, S.B.** (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-11
- Bolton, D.C., Meyer, R.K. und Prusiner, S.B.** (1985) Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* **53**, 596-606
- Bonn, D.** (2000) New predictions for total vCJD mortality lower than before. *Lancet* **356**, 570
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54
- Brandon, E.P., Idzerda, R.L. und McKnight, G.S.** (1995) Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts. *Curr Biol* **5**, 873-81
- Brody, E.N., Willis, M.C., Smith, J.D., Jayasena, S., Zichi, D. und Gold, L.** (1999) The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics. *Mol Diagn* **4**, 381-8
- Bruce, M.E., McBride, P.A. und Farquhar, C.F.** (1989) Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* **102**, 1-6
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. und Bostock, C.J.** (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501

Literaturverzeichnis

- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. und Weissmann, C.** (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-47
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M. und Weissmann, C.** (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82
- Burgin, A.B. und Pace, N.R.** (1990) Mapping the active site of ribonuclease P RNA using a substrate containing a photoaffinity agent. *Embo J* **9**, 4111-8
- Burgstaller, P. und Famulok, M.** (1994) Isolation of RNA-Aptamers for biological cofactors by in vitro Selection. *Angew. Chem Int. Ed*, **33**, 1084-1087
- Buschauer, B., Dove** (2000) NPY-Rezeptoren als Zielstrukturen für neue Arzneistoffe. *Pharm. Ztg.* **24**,
- Cabrele, C. und Beck-Sickinger, A.G.** (2000) Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. *J Pept Sci* **6**, 97-122
- Cabrele, C., Langer, M., Bader, R., Wieland, H.A., Doods, H.N., Zerbe, O. und Beck-Sickinger, A.G.** (2000) The First Selective Agonist at the Neuropeptide Y Y5-Receptor Increases Food Intake in Rats. *J Biol Chem*
- Caughey, B., Ernst, D. und Race, R.E.** (1993) Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol* **67**, 6270-2
- Caughey, B. und Raymond, G.J.** (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**, 18217-23
- Caughey, B. und Raymond, G.J.** (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* **67**, 643-50
- Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A. und Lansbury, P.T., Jr.** (1997) Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J Virol* **71**, 4107-10
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F. und Caughey, W.S.** (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27- 30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-80
- Chabry, J., Caughey, B. und Chesebro, B.** (1998) Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* **273**,

Literaturverzeichnis

13203-7

Charlton, J., Sennello, J. und Smith, D. (1997) In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* **4**, 809-16

Chronwall, B.M. (1985) Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* **6**, 1-11

Conlon, J.M., Bjornholm, B., Jorgensen, F.S., Youson, J.H. und Schwartz, T.W. (1991) Primary structure and conformational analysis of peptide methionine-tyrosine, a peptide related to neuropeptide Y and peptide YY isolated from lamprey intestine. *Eur J Biochem* **199**, 293-8

Convery, M.A., Rowsell, S., Stonehouse, N.J., Ellington, A.D., Hirao, I., Murray, J.B., Peabody, D.S., Phillips, S.E. und Stockley, P.G. (1998) Crystal structure of an RNA aptamer-protein complex at 2.8 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**, 133-9

Cox, J.C., Rudolph, P. und Ellington, A.D. (1998) Automated RNA selection. *Biotechnol Prog* **14**, 845-50

Dang, C. und Jayasena, S.D. (1996) Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J Mol Biol* **264**, 268-78

Darbon, H., Bernassau, J.M., Deleuze, C., Chenu, J., Roussel, A. und Cambillau, C. (1992) Solution conformation of human neuropeptide Y by ¹H nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics. *Eur J Biochem* **209**, 765-71

Dean, P., Johnson, WS und Middle, FA (1995) Affinity chromatography.

DeArmond, S.J. und Prusiner, S.B. (1993) The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem* **61**, 1589-601

Doh-Ura, K., Iwaki, T. und Caughey, B. (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* **74**, 4894-7

Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. und Dyson, H.J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13452-7

Drolet, D.W., Moon-McDermott, L. und Romig, T.S. (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* **14**, 1021-5

Literaturverzeichnis

- Dumont, Y., Cadieux, A., Doods, H., Pheng, L.H., Abounader, R., Hamel, E., Jacques, D., Regoli, D. und Quirion, R.** (2000) BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **129**, 1075-88
- Dumont, Y., Martel, J.C., Fournier, A., St-Pierre, S. und Quirion, R.** (1992) Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol* **38**, 125-67
- Eckard, C.P., Beck-Sickinger, A.G. und Wieland, H.A.** (1999) Comparison of antibodies directed against receptor segments of NPY- receptors. *J Recept Signal Transduct Res* **19**, 379-94
- Eigen, M.** (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* **63**, A1-18
- Ellington, A.D. und Szostak, J.W.** (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-22
- Famulok** (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1698-1706
- Famulok, M.** (1999) Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 324-9
- Famulok, M., Mayer, G. und Blind, M.** (2000) Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo. *Acc Chem Res* **33**, 591-9
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. und Weissmann, C.** (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* **15**, 1255-64
- Floege, J. und Johnson, R.J.** (1995) Multiple roles for platelet-derived growth factor in renal disease. *Miner Electrolyte Metab* **21**, 271-82
- Floege, J., Ostendorf, T., Janssen, U., Burg, M., Radeke, H.H., Vargeese, C., Gill, S.C., Green, L.S. und Janjic, N.** (1999) Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo: antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephritis by aptamers. *Am J Pathol* **154**, 169-79
- Flood, J.F., Baker, M.L., Hernandez, E.N. und Morley, J.E.** (1989) Modulation of memory processing by neuropeptide Y varies with brain injection site. *Brain Res* **503**, 73-82

Literaturverzeichnis

- Fried, M. und Crothers, D.M.** (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**, 6505-25
- Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thogersen, H., Melberg, S.G., Olsen, U.B., Thastrup, O. und Schwartz, T.W.** (1990) [Leu31, Pro34]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 182-6
- Gajdusek, C.** (1967) Discussion on kuru, scrapie and the experimental kuru-like syndrome in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* **40**, 59-63
- Garcia, Z., Riek, Wüthrich** (2000) NMR-Structure of the bovine prion protein. *PNAS* **97**, 8334-8339
- Gasset, M., Baldwin, M.A., Lloyd, D.H., Gabriel, J.M., Holtzman, D.M., Cohen, F., Fletterick, R. und Prusiner, S.B.** (1992) Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10940-4
- Gellert, L., Davies** (1962) *PNAS* **48**, 2013-2018
- Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., Schaffhauser, A.O., Whitebread, S., Hofbauer, K.G., Taber, R.I., Branchek, T.A. und Weinshank, R.L.** (1996) A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* **382**, 168-71
- German, I., Buchanan, D.D. und Kennedy, R.T.** (1998) Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis. *Anal Chem* **70**, 4540-5
- Gilbert, B.A., Sha, M., Wathen, S.T. und Rando, R.R.** (1997) RNA aptamers that specifically bind to a K Ras-derived farnesylated peptide. *Bioorg Med Chem* **5**, 1115-22
- Giver, L., Bartel, D.P., Zapp, M.L., Green, M.R. und Ellington, A.D.** (1993) Selection and design of high-affinity RNA ligands for HIV-1 Rev. *Gene* **137**, 19-24
- Glover, I., Haneef, I., Pitts, J., Wood, S., Moss, D., Tickle, I. und Blundell, T.** (1983) Conformational flexibility in a small globular hormone: x-ray analysis of avian pancreatic polypeptide at 0.98-Å resolution. *Biopolymers* **22**, 293-304
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. und Yarus, M.** (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* **64**, 763-97

Literaturverzeichnis

- Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. und Janjic, N.** (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol* **2**, 683-95
- Green, L.S., Jellinek, D., Jenison, R., Ostman, A., Heldin, C.H. und Janjic, N.** (1996) Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. *Biochemistry* **35**, 14413-24
- Griffith, J.S.** (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-4
- Grouzmann, E., Alvarez-Bolado, G., Meyer, C., Osterheld, M.C., Burnier, M., Brunner, H.R. und Waeber, B.** (1994) Localization of neuropeptide Y and its C-terminal flanking peptide in human renal tissue. *Peptides* **15**, 1377-82
- Grouzmann, E., Comoy, E., Walker, P., Burnier, M., Bohuon, C., Waeber, B. und Brunner, H.** (1992) Production and characterization of four anti-neuropeptide Y monoclonal antibodies. *Hybridoma* **11**, 409-24
- Grouzmann, E., Deruaz, J.P., Gomez, F. und Waeber, G.** (1998) Immunolocalization of neuropeptide Y in human pituitary tumours. *Regul Pept* **75-76**, 89-92
- Hall, A.C., Earle-Cruikshanks, G. und Harrington, M.E.** (1999) Role of membrane conductances and protein synthesis in subjective day phase advances of the hamster circadian clock by neuropeptide Y. *Eur J Neurosci* **11**, 3424-32
- Harada, K. und Frankel, A.D.** (1995) Identification of two novel arginine binding DNAs. *Embo J* **14**, 5798-811
- Head, M. W. und Ironside, J. W.** (2000), *Trends in Microbiol* **8**, 6-8
- Heidenreich, O., Pieken, W. und Eckstein, F.** (1993) Chemically modified RNA: approaches and applications. *Faseb J* **7**, 90-6
- Heilig, M., McLeod, S., Brot, M., Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Koob, G.F. und Britton, K.T.** (1993) Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology* **8**, 357-63
- Hendeles, L. und Weinberger, M.** (1983) Theophylline. A "state of the art" review. *Pharmacotherapy* **3**, 2-44
- Hermann, T. und Patel, D.J.** (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**, 820-5

Literaturverzeichnis

- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32
- Hicke, B.J., Watson, S.R., Koenig, A., Lynott, C.K., Bargatze, R.F., Chang, Y.F., Ringquist, S., Moon-McDermott, L., Jennings, S., Fitzwater, T., Han, H.L., Varki, N., Albinana, I., Willis, M.C., Varki, A. und Parma, D.** (1996) DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J Clin Invest* **98**, 2688-92
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J. und Lantos, P.** (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-50, 526
- Hill, A.F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P.L. und Collinge, J.** (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10248-53
- Hofmann, H.P., Limmer, S., Hornung, V. und Sprinzl, M.** (1997) Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *Rna* **3**, 1289-300
- Hölscher, C., Delius, H. und Bürkle, A.** (1998) Overexpression of Nonconvertible PrP^C delta 114-121 in Scrapie -Infected Mouse Neuroblastoma Cells Leads to *trans*-Dominant Inhibition of Wild-Type PrP^{Sc} Accumulation. *J. of Virology* 1153-1159
- Homann, M. und Goringer, H.U.** (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* **27**, 2006-14
- Horwich, A.L. und Weissman, J.S.** (1997) Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. *Cell* **89**, 499-510
- Huizenga, D.E. und Szostak, J.W.** (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **34**, 656-65
- Ingenhoven, N. und Beck-Sickinger, A.G.** (1999) Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of neuropeptide Y. *Curr Med Chem* **6**, 1055-66
- Inui** (1999) Neuropeptide Y Feeding Rezeptors. *TIPS* **20**,
- Inui, A.** (1999) Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci* **22**, 62-7
- Jayasena, S.D.** (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival

Literaturverzeichnis

antibodies in diagnostics. *Clin Chem* **45**, 1628-50

Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C. und Janjic, N. (1994) Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry* **33**, 10450-6

Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C., Lynott, C.K., Gill, N., Vargeese, C., Kirschenheuter, G., McGee, D.P., Abesinghe, P., Pieken, W.A. und et al. (1995) Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* **34**, 11363-72

Jendroska, K., Heinzl, F.P., Torchia, M., Stowring, L., Kretzschmar, H.A., Kon, A., Stern, A., Prusiner, S.B. und DeArmond, S.J. (1991) Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity. *Neurology* **41**, 1482-90

Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. und Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425-9

Kalra, S.P., Fuentes, M., Fournier, A., Parker, S.L. und Crowley, W.R. (1992) Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology* **130**, 3323-30

Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S.B. und Riesner, D. (1993) Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch Virol Suppl* **7**, 215-25

Kellings, K., Prusiner, S.B. und Riesner, D. (1994) Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **343**, 425-30

Keshet, G.I., Bar-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U. und Gabizon, R. (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* **75**, 1889-97

Klug, S.J. und Famulok, M. (1994) All you wanted to know about SELEX. *Mol Biol Rep* **20**, 97-107

Klug, S.J., Huttenhofer, A. und Famulok, M. (1999) In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *Rna* **5**, 1180-90

Literaturverzeichnis

- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A. und Furste, J.P.** (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine.
- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. und Oesch, B.** (1997) Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**, 74-7
- Kretzschmar** (2000) BSE und andere Prionenerkrankungen. *MMW* **89**, 34-38
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5
- Larhammar, D.** (1996) Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* **62**, 1-11
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Hauw, J.J. und Dormont, D.** (1996) Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **77**, 1601-9
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. und Hauw, J.J.** (1996) BSE transmission to macaques [letter]. *Nature* **381**, 743-4
- Lauhon, S.** (1995) *J. Am. Soc.* **117**, 1246-1257
- Lin, Y. und Jayasena, S.D.** (1997) Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. *J Mol Biol* **271**, 100-11
- Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feistner, B. und Jayasena, S.D.** (1996) High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acids Res* **24**, 3407-14
- Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S.C. und Jayasena, S.D.** (1994) Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res* **22**, 5229-34
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D. und Kuhajda, F.P.** (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* **288**, 2379-81
- Lottspeich, Z.** (1998) Bioanalytik.
- Lundberg, J.M., Pernow, J., Fried, G. und Anggard, A.** (1987) Neuropeptide Y and noradrenaline mechanisms in relation to reserpine induced impairment of

Literaturverzeichnis

sympathetic neurotransmission in the cat spleen. *Acta Physiol Scand* **131**, 1-10

Manuelidis, L., Sklaviadis, T., Akowitz, A. und Fritch, W. (1995) Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5124-8

Masson, C., Delalande, I., Deslys, J.P., Henin, D., Fallet-Bianco, C., Dormont, D. und Leys, D. (1994) Creutzfeldt-Jakob disease after pituitary-derived human growth hormone therapy: two cases with valine 129 homozygous genotype. *Neurology* **44**, 179-80

Maturi, M.F., Greene, R., Speir, E., Burrus, C., Dorsey, L.M., Markle, D.R., Maxwell, M., Schmidt, W., Goldstein, S.R. und Patterson, R.E. (1989) Neuropeptide-Y. A peptide found in human coronary arteries constricts primarily small coronary arteries to produce myocardial ischemia in dogs. *J Clin Invest* **83**, 1217-24

McDonald, J.K., Lumpkin, M.D., Samson, W.K. und McCann, S.M. (1985) Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 561-4

McKinley, M.P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. und Gonatas, N. (1991) Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* **65**, 622-30

Medizinreport (2000) Vom BSE-Schnelltest bis zum Nachweis von Prionen im Blut. *Deutsches Ärzteblatt* **49**, 2473-2475

Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W.S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F.E., Vandlen, R., Henner, D. und Prusiner, S.B. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* **35**, 5528-37

Meyer, R.K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A. und Vandevelde, M. (2000) A Monomer-Dimer Equilibrium of a Cellular Prion Protein (PrPC) Not Observed with Recombinant PrP. *J Biol Chem* **275**, 38081-38087

Michel, M.C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion, R., Schwartz, T. und Westfall, T. (1998) XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 143-50

Literaturverzeichnis

- Moltz, J.H. und McDonald, J.K.** (1985) Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides* **6**, 1155-9
- Monks, S.A., Karagianis, G., Howlett, G.J. und Norton, R.S.** (1996) Solution structure of human neuropeptide Y. *J Biomol NMR* **8**, 379-90
- Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E. und Westaway, D.** (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**, 797-817
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. und Kellermann, O.** (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-8
- Murchie, A.I. und Lilley, D.M.** (1994) Tetraplex folding of telomere sequences and the inclusion of adenine bases. *Embo J* **13**, 993-1001
- Nieuwlandt, D., Wecker, M. und Gold, L.** (1995) In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry* **34**, 5651-9
- Nolte, A., Klusmann, S., Bald, R., Erdmann, V.A. und Furste, J.P.** (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol* **14**, 1116-9
- O'Donohue, T.L., Chronwall, B.M., Pruss, R.M., Mezey, E., Kiss, J.Z., Eiden, L.E., Massari, V.J., Tessel, R.E., Pickel, V.M., DiMaggio, D.A. und et al.** (1985) Neuropeptide Y and peptide YY neuronal and endocrine systems. *Peptides* **6**, 755-68
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E. und et al.** (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46
- Osborne, S.E., Matsumura, I. und Ellington, A.D.** (1997) Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. *Curr Opin Chem Biol* **1**, 5-9
- Ostendorf, F.** (1999) *Med. Klin.* **94**, 219-223
- Ozel, M. und Diring, H.** (1994) Small virus-like structure in fractions from scrapie hamster brain. *Lancet* **343**, 894-5
- Ozel, M., Xi, Y.G., Baldauf, E., Diring, H. und Pocchiari, M.** (1994) Small virus-

Literaturverzeichnis

like structure in brains from cases of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **344**, 923-4

Pagratis, N.C., Bell, C., Chang, Y.F., Jennings, S., Fitzwater, T., Jellinek, D. und Dang, C. (1997) Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol* **15**, 68-73

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* **289**, 739-45

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. und et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-6

Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Wills, J.W., Golovine, S. und Wang, J.F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11509-13

Parchi, P., Capellari, S., Chen, S.G., Petersen, R.B., Gambetti, P., Kopp, N., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Giese, A. und Kretzschmar, H. (1997) Typing prion isoforms. *Nature* **386**, 232-4

Peretz, D., Williamson, R.A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R.B., Rozenshteyn, R., James, T.L., Houghten, R.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. und Burton, D.R. (1997) A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol* **273**, 614-22

Perney, T.M. und Miller, R.J. (1989) Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J Biol Chem* **264**, 7317-27

Poncelet, S.M., Limet, J.N., Noel, J.P., Kayaert, M.C., Galanti, L. und Collet-Cassart, D. (1990) Immunoassay of theophylline by latex particle counting. *J Immunoassay* **11**, 77-88

Potyrailo, R.A., Conrad, R.C., Ellington, A.D. und Hieftje, G.M. (1998) Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal Chem* **70**, 3419-25

Priola, S.A., Caughey, B., Wehrly, K. und Chesebro, B. (1995) A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP.

Literaturverzeichnis

J Biol Chem **270**, 3299-305

Prusiner (1999) Prions.

Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44

Prusiner, S.B. (1991) Prion biology and diseases. *Harvey Lect* **87**, 85-114

Prusiner, S.B. (1996) Human prion diseases and neurodegeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* **207**, 1-17

Prusiner, S.B. (1998) The prion diseases. *Brain Pathol* **8**, 499-513

Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S.L. und DeArmond, S.J. (1993) Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10608-12

Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A. und et al. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-86

Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. und Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-48

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. und Wuthrich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* **413**, 282-8

Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E. und Prusiner, S.B. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**, 1157-65

Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. und Noda, T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-31

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7

Saudek, V. und Pelton, J.T. (1990) Sequence-specific ¹H NMR assignment and secondary structure of neuropeptide Y in aqueous solution. *Biochemistry* **29**, 4509-

Literaturverzeichnis

15

Schatzl, H.M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F.E. und Prusiner, S.B. (1995) Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362-74

Scott, M.R., Kohler, R., Foster, D. und Prusiner, S.B. (1992) Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* **1**, 986-97

Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. und Prusiner, S.B. (1999) Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15137-42

Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A. und Weissmann, C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203-14

Snow, A.D., Wight, T.N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S.J. und Prusiner, S.B. (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest* **63**, 601-11

Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. und Prusiner, S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-40

Steinmüller, A.u.K. (1985) Charles Darwin: Vom Käfersammler zum Naturforscher.

Strosberg, D. (1992) [Biotechnology of beta-adrenergic receptors]. *Pathol Biol (Paris)* **40**, 767-72

Sundquist, W.I. und Klug, A. (1989) Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* **342**, 825-9

Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H.O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. und Scott, M. (1999) Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96**, 869-78

Symensma, T.L., Giver, L., Zapp, M., Takle, G.B. und Ellington, A.D. (1996) RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type 1 Rev in vitro are Rev responsive in vivo. *J Virol* **70**, 179-87

Taraboulos, A., Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Serban, D. und Prusiner, S.B.

Literaturverzeichnis

(1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* **3**, 851-63

Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S.B. und Avraham, D. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* **129**, 121-32

Tatemoto, K., Carlquist, M. und Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* **296**, 659-60

Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. und Prusiner, S.B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90

Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, I.L. und Palmiter, R.D. (1998) Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels [see comments]. *Nature* **396**, 366-9

Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. und Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-42

Tonan, K., Kawata, Y. und Hamaguchi, K. (1990) Conformations of isolated fragments of pancreatic polypeptide. *Biochemistry* **29**, 4424-9

Tucker, C.E., Chen, L.S., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Gill, S.C. und Drolet, D.W. (1999) Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **732**, 203-12

Tuerk, C. und Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-10

Valegard, K., Liljas, L., Fridborg, K. und Unge, T. (1990) The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* **345**, 36-41

Vital, C., Gray, F., Vital, A., Parchi, P., Capellari, S., Petersen, R.B., Ferrer, X., Jarnier, D., Julien, J. und Gambetti, P. (1998) Prion encephalopathy with insertion of octapeptide repeats: the number of repeats determines the type of cerebellar

Literaturverzeichnis

deposits. *Neuropathol Appl Neurobiol* **24**, 125-30

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-9

Wahlestedt, C. und Hakanson, R. (1986) Effects of neuropeptide Y (NPY) at the sympathetic neuroeffector junction. Can pre- and postjunctional receptors be distinguished? *Med Biol* **64**, 85-8

Walker, M.W., Ewald, D.A., Perney, T.M. und Miller, R.J. (1988) Neuropeptide Y modulates neurotransmitter release and Ca²⁺ currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* **8**, 2438-46

Wallis, M.G., von Ahsen, U., Schroeder, R. und Famulok, M. (1995) A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol* **2**, 543-52

Wang, Y. und Patel, D.J. (1992) Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry* **31**, 8112-9

Wang, Y. und Rando, R.R. (1995) Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol* **2**, 281-90

Weiss, S., Famulok, M., Edenhofer, F., Wang, Y.H., Jones, I.M., Groschup, M. und Winnacker, E.L. (1995) Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrP^c as a glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J Virol* **69**, 4776-83

Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretschmar, H.A., Famulok, M. und Winnacker, E.L. (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* **71**, 8790-7

Weissmann, C. (1995) Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *Prog Brain Res* **105**, 15-22

Wiegand, T.W., Williams, P.B., Dreskin, S.C., Jouvin, M.H., Kinet, J.P. und Tasset, D. (1996) High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol* **157**, 221-30

Wilesmith, J.W., Ryan, J.B. und Atkinson, M.J. (1991) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**, 199-203

Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. und Smith, P.G. (1996) A new variant of

Literaturverzeichnis

Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-5

Williams, K.P., Liu, X.H., Schumacher, T.N., Lin, H.Y., Ausiello, D.A., Kim, P.S. und Bartel, D.P. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11285-90

Willis, M.C., Collins, B.D., Zhang, T., Green, L.S., Sebesta, D.P., Bell, C., Kellogg, E., Gill, S.C., Magallanez, A., Knauer, S., Bendele, R.A., Gill, P.S., Janjic, N. und Collins, B. (1998) Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers [published erratum appears in *Bioconjug Chem* 1998 Sep-Oct;9(5):633]. *Bioconjug Chem* **9**, 573-82

Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T. und Schatzl, H.M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**, 1163-78

Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J. und Wallace, R.B. (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* **10**, 233-8

Xu, W. und Ellington, A.D. (1996) Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7475-80

Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. und Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-50

Lebenslauf

Daniela Proske

Persönliche Daten

geboren am 12.08.1971 in Sangerhausen
Familienstand: ledig
Eltern: Konrad und Sonja Proske, geb. Ebhardt

Promotion

Institut für Biochemie der LMU München unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker: Neuropeptid Y – und Prionprotein-spezifische Aptamere: Selektion, Charakterisierung und biologische Funktion von März 1996 bis Dezember 2000

Studium

Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. A. Schellenberger am Institut für Biotechnologie und Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle: Charakterisierung der Bindung der Cofaktoren FAD und TPP an die Pyruvatoxidase aus *L. plantarum* (Note 1,1)
Oktober 1994 – Oktober 1995
Diplomprüfung im Oktober 1994 (Note 1,2)
Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Biochemie
Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle
Oktober 1990 – Oktober 1995

Schulbildung

Prüfung der Allgemeinen Hochschulreife im Juni 1990 (Note 1,0)
Erweiterte Oberschule Wilhelm Pieck, Querfurt
September 1988 – Juni 1990
Polytechnische Oberschule Thomas Münzer, Allstedt
September 1978 – September 1988