

## 4 Ergebnisse

Die große Bedeutung des Amyloids im Verlauf der Alzheimerschen Krankheit ist unbestritten, obwohl die Ursachen der Krankheit immer noch unbekannt sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Ablagerungen dieses Peptids in den Gehirnen der Patienten neurotoxisch wirken. Durch Einsatz der RNA-Technologien sollen in dieser Arbeit mit Hilfe der *in vitro*-Selektion hochaffine RNA-Moleküle gegen das Amyloid und ein Amyloidfragment gewonnen werden. Diese Aptamere sollen als Hilfsmittel zur weiteren Erforschung der Krankheit dienen und könnten sich vielleicht als Hilfsmittel für die Diagnose von Alzheimer erweisen. So wurden bereits Antikörper gegen das  $\beta$ A4-Amyloid vorgestellt, die eine Aggregation zu den senilen Plaques verhindern können (Solomon *et al.*, 1996). Weiterhin existieren Studien, die besagen, daß der Amyloidgehalt im Blut von Alzheimer-Patienten sich von dem gesunder Menschen unterscheidet (Li *et al.*, 1995, Rosenberg *et al.*, 1997, Di Luca *et al.*, 1998). Dies läßt hoffen, daß es für diese weitverbreitete Krankheit in näherer Zukunft eine Diagnose und wirkungsvolle Medikamente geben wird.

Aptamere besitzen ähnliche Eigenschaften wie Antikörper, haben den Antikörpern gegenüber aber einige Vorteile. Sie sind kleiner und können durch chemische Synthese in hoher Reinheit produziert werden. Die chemische Synthese erlaubt auch eine gezielte Modifizierung bzw. den Einbau von Reportermolekülen, was für einen Einsatz in der Forschung und Diagnose von großem Interesse ist. Ihre hohe Spezifität konnte bereits in vielen Arbeiten gezeigt werden (Jenison *et al.*, 1994, Pagratis *et al.*, 1997).

In den Amyloid-Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten findet man das Amyloid in der unlöslichen  $\beta$ -Faltblattstruktur vor. Der Übergang von der löslichen  $\alpha$ -Helix- bzw. Knäuelform in die  $\beta$ -Faltblattstruktur verläuft in wäßriger Lösung relativ schnell und ist abhängig von einigen Parametern, wie z. B. der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Es konnte gezeigt werden, daß die Änderung der Konformation von den unpolaren Aminosäuren am C-terminalen Ende des Amyloids ausgeht. Durch Verkürzen des Amyloids kann man daher Peptide erzeugen, die sich wesentlich langsamer bzw. fast gar nicht in die unlösliche  $\beta$ -Faltblattstruktur umwandeln. Da diese verkürzten Peptide deutlich einfacher zu handhaben und zudem auch noch kostengünstiger sind, sollen in dieser Arbeit Aptamere gegen ein Fragment des Amyloids gewonnen werden. Da nicht gewährleistet ist, daß das Aptamer gegen das Fragment auch das Amyloid erkennt, soll zusätzlich auch noch gegen das komplette  $\beta$ A4

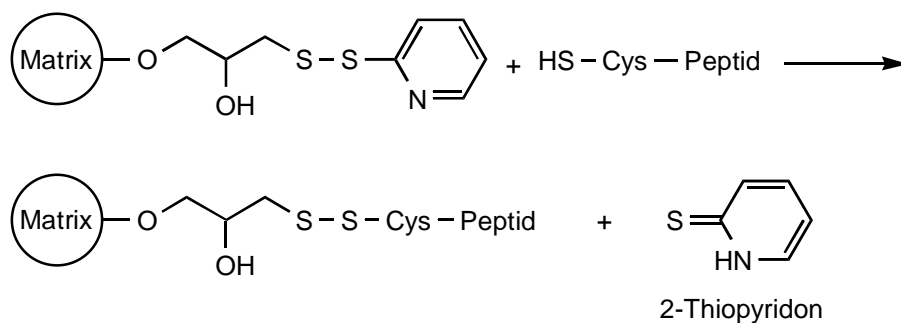
selektiert werden. Es wäre denkbar, daß man auf diese Weise auch Aptamere gegen die lösliche und unlösliche Konformation gewinnen könnte. Die beiden Peptide wurden chemisch synthetisiert und von Schering AG zur Verfügung gestellt.

Cys- $\beta$ A4(1-16): NH<sub>2</sub>-Cys-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-COOH

Cys- $\beta$ A4(1-40): NH<sub>2</sub>-Cys-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-COOH

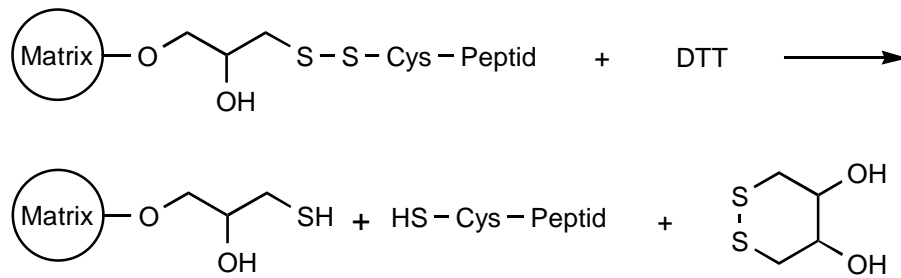
## 4.1 Immobilisierung der Peptide

Für die Selektion durch Affinitätschromatographie wurden die beiden Peptide reversibel auf einer Matrix immobilisiert. Dazu wurden die Peptide mit einem Cystein am N-terminalen Ende synthetisiert, um eine Immobilisierung auf Thiopropyl-Sepharose 6B (Pharmacia) über Disulfidbrücken zu ermöglichen. Die freie Thiolgruppe des Peptids substituiert die Pyridylgruppe, die durch Umwandlung in das stabile 2-Thiopyridon eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt (Abb. 5).



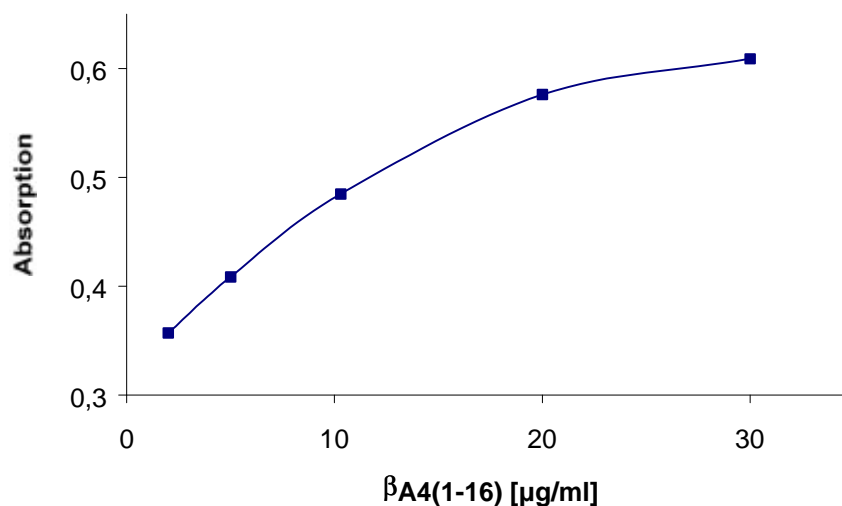
**Abb. 5:** Immobilisierung des Peptids auf der Thiopropyl-Sepharose.

Durch Waschen mit Dithiothreitol (DTT) kann die Disulfidbrücke reaktiv gespalten werden und das Peptid wieder von der Matrix eluiert werden (Abb. 6).



**Abb. 6: Elution des Peptids von dem Säulenmaterial.**

Da das bei der Immobilisierung freigesetzte 2-Thiopyridon bei 343 nm absorbiert, sollte eine Bestimmung der Konzentration des Peptids auf dem Säulenmaterial durch photometrische Konzentrationsbestimmung des freigesetzten Thiopyridons möglich sein. Diese Methode führte jedoch zu hohen, nicht reproduzierbaren Werten. Daher wurde das Peptid von 100  $\mu\text{l}$  Säulenmaterial mit DTT eluiert und die Konzentration im Eluat mit Hilfe des Coomassie Proteinassays bestimmt. Da der Assay nicht linear ist, mußte zuvor eine Standardkurve mit verschiedenen Peptidkonzentrationen aufgenommen werden (Abb. 7). Durch Messung der Absorption bei 595 nm und Vergleich mit der Standardkurve wurde beim  $\beta\text{A4}(1-16)$  eine Beladung von 46  $\mu\text{M}$  ermittelt.



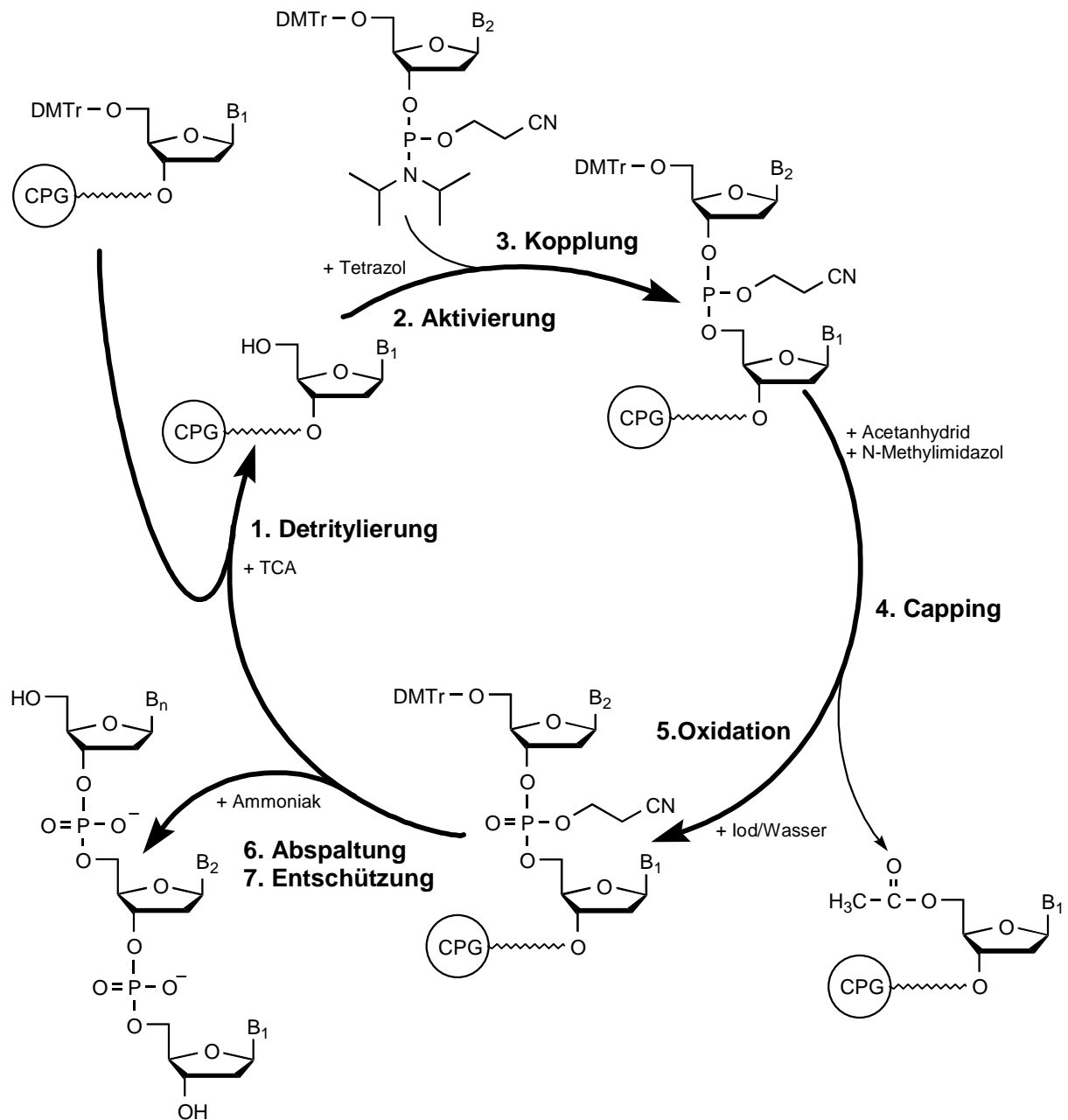
**Abb.7: Standardkurve für den Coomassie-Protein-Assay.**

Aufgrund der hohen Tendenz zur Aggregation konnte dieser Assay beim  $\beta$ A4(1-40) nicht verwendet werden. Deshalb wurde die Konzentration des Peptids im Eluat durch Aminosäureanalyse bestimmt. Die Aminosäureanalyse wurde von Dr. Schröder (AG Prof. Erdmann, FU Berlin) durchgeführt. Dazu wurde das Eluat hydrolysiert und auf einen Proteinsequencer aufgetragen. Durch Mittelung der Peakflächen der einzelnen Aminosäuren und Vergleich mit einer Probe bekannter Konzentration konnte die Konzentration auch beim  $\beta$ A4(1-40) bestimmt werden. Die Beladung des Säulenmaterial mit  $\beta$ A4(1-16) lag bei dieser Bestimmung bei 40  $\mu$ M, während sie beim  $\beta$ A4(1-40) 4  $\mu$ M entsprach.

## 4.2 *In vitro*-Selektion

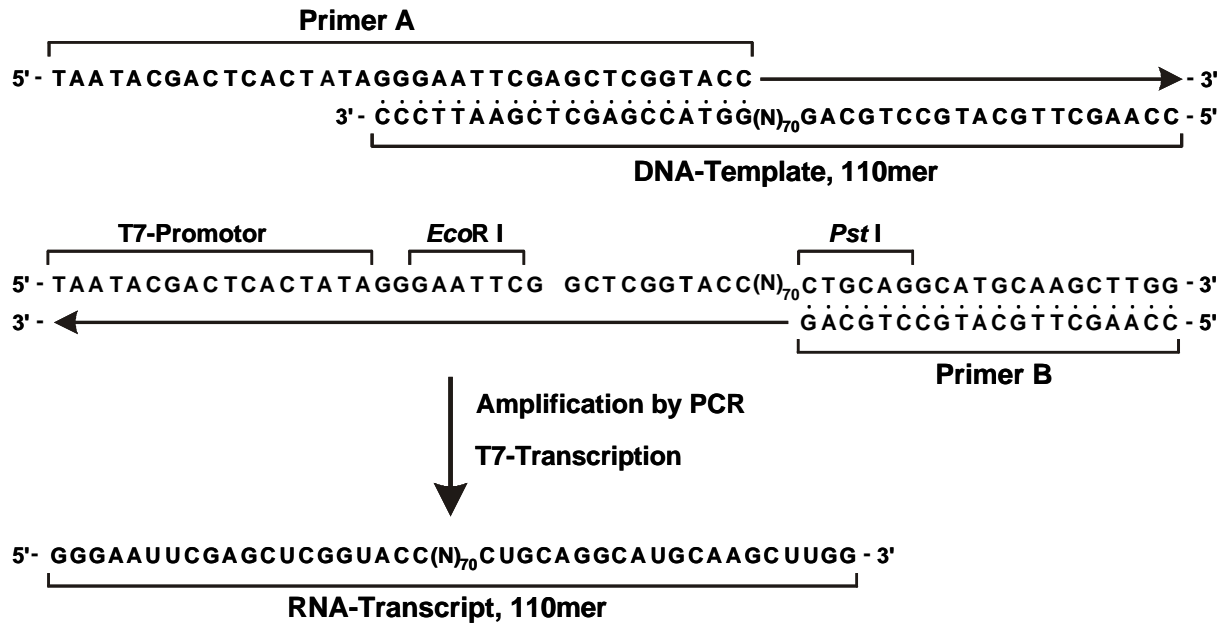
### Erstellung der RNA-Bibliothek

Die RNA-Bibliothek entsteht durch *in vitro*-Transkription aus einer DNA-Bibliothek, die chemisch an einer Festphase synthetisiert wurde. Sie wurde mit Hilfe einer Synthesemaschine als einzelsträngige DNA, bestehend aus zwei Primern aus jeweils 20 Nukleotiden und einer 70 Nukleotide langen randomisierten Region, erstellt. Für die Synthese von 3' in 5' Richtung wurde die übliche Phosphoramiditchemie verwendet (Abb. 8). Den zufälligen Einbau der vier Nukleotide erreicht man durch Verwendung einer Lösung aus allen vier DNA-Phosphoramiditen, wobei die unterschiedliche Reaktivität im Mischungsverhältnis berücksichtigt wurde ( $dA : dG : dC : dT = 3 : 2,5 : 2,5 : 2$ ). Bei einem randomisierten Bereich aus 70 Nukleotiden sind theoretisch  $4^{70}$  oder  $1,4 \cdot 10^{42}$  verschiedene Moleküle denkbar. Dies entspricht allerdings  $2,3 \cdot 10^{18}$  mol oder  $8,2 \cdot 10^{19}$  kg. Dagegen ist die tatsächlich synthetisierte Menge von ca.  $10^{15}$  Molekülen so gering, daß es statistisch sehr unwahrscheinlich ist, daß zwei gleiche Moleküle synthetisiert wurden. Die Ausbeute jeder einzelnen Kopplung der Synthese lag über 99 % und konnte durch die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe verfolgt werden. Jedoch lag die Gesamtausbeute aufgrund der vielen Kopplungen und der großen Verluste bei der Aufreinigung über ein Polyacrylamidgel lediglich bei knapp 2 % oder 3,8 nmol. Von dieser DNA müssen die Moleküle abgezogen werden, die aufgrund von Fehlern bei der Synthese (z. B. keine vollständige Abspaltung der Schutzgruppe, Abspaltung der Basen etc.) nicht durch PCR amplifizierbar sind. Dazu wurde eine Probe dieser DNA in einem PCR-Zyklus mit radioaktiv markierten Desoxynukleotid umgesetzt und die Menge an produzierten Gegenstrang quantifiziert. Der Anteil an durch PCR amplifizierbarer DNA lag bei 42 % oder 1,6 nmol. Daraus ergibt sich eine Komplexität von ca.  $1 \cdot 10^{15}$  Molekülen.



**Abb. 8: Zyklus der DNA-Synthese.** Der Zyklus beginnt mit der Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) des an das Säulenmaterial (CPG, controlled pore glass) gekoppelten ersten Nucleosids durch Trichloressigsäure (TCA). Im nächsten Schritt wird das zu koppelnde Phosphoramidit zusammen mit dem Aktivator Tetrazol auf die Säule gegeben. Die 5'-Hydroxylgruppe des immobilisierten Nucleosids kann am aktivierten Phosphor angreifen und das Diisopropylamin nukleophil substituieren. Nicht umgesetzte 5'-Hydroxylgruppen werden mit Essigsäureanhydrid und N-Methylimidazol als Aktivator acetyliert und damit dem weiteren Syntheseyklus entzogen. Im fünften Schritt wird der Phosphittriestere durch Iod zum stabileren Phosphattriestere oxidiert. Mit der Abspaltung der 5'-terminalen DMTr-Schutzgruppe beginnt der nächste Zyklus. Nach Kopplung der letzten Base erfolgt die alkalische Abspaltung der Basen- und der Phosphatschutzgruppen sowie die Abspaltung vom Säulenmaterial durch Ammoniak.

Die einzelsträngige DNA-Bibliothek wurde durch PCR zum Doppelstrang komplettiert und vervielfältigt. Dabei wurde zusätzlich durch Verwendung eines verlängerten Primers die 17 Nukleotide lange T7-Promotorsequenz eingefügt, die für eine Transkription in RNA benötigt wurde (Abb. 9). Bei dieser PCR-Reaktion lag das Ziel in einer kleinen Vermehrung einer sehr großen DNA-Menge. Der DNA-Pool wurde um den Faktor 13 vervielfältigt.

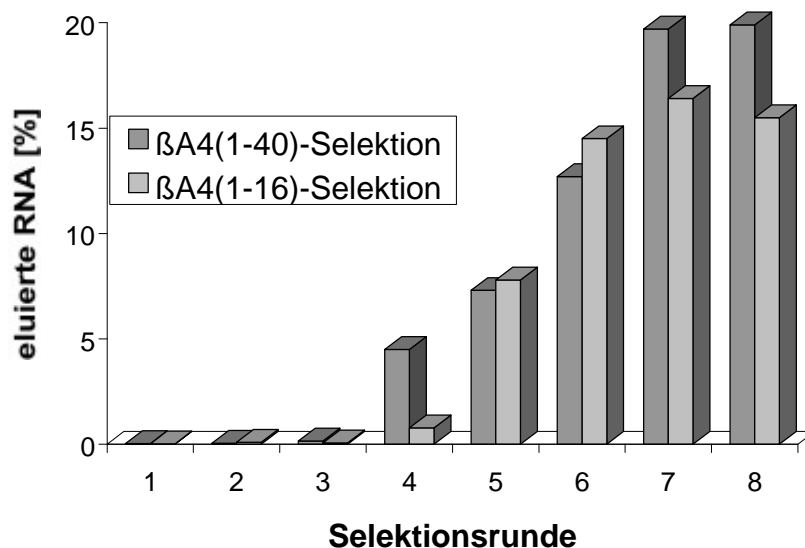


**Abb. 9: Erstellung der RNA-Bibliothek.** Der chemisch synthetisierte DNA-Strang (110mer) mit einer randomisierten Region von 70 Nukleotiden  $N_{70}$  wird durch PCR mit Hilfe des Primers A um die 17 Nukleotide lange T7-Promotorsequenz verlängert und durch den Primer B zum Doppelstrang komplettiert. Die RNA-Bibliothek (110mer) entsteht aus der amplifizierten DNA (127mer) durch T7-Transkription.

### Durchführung der Selektion

Die Selektion für das  $\beta A4(1-16)$  und das  $\beta A4(1-40)$  wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Der verwendete Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA) wurde so an die Selektionsbedingungen angepaßt, daß in einer Testselektion die unspezifischen Wechselwirkungen auf der Selektionssäule minimiert wurden. Die Selektion wurde in Kunststoffsäulen mit einer kleinen Fritte am unteren Ende und einer großen Fritte über dem Säulenmaterial durchgeführt. Die Säule sowie die Fritten wurden vor der Selektion silikonisiert, um eine Adsorption der RNA so gering wie möglich zu halten. Weiterhin wurde nach der Ethanol-fällung der RNA im Anschluß an die T7-

Transkription nur noch mit silikonisierten Eppendorfgläsern gearbeitet. In jeder Selektionsrunde wurde mit einer Vorsäule mit Säulenmaterial ohne Peptid gearbeitet, um RNA-Moleküle abzutrennen, die spezifisch an das Säulenmaterial binden. Da die RNA-Menge, die in der ersten Runde auf die Säule aufgetragen wurde, um ein Vielfaches größer war als in den folgenden Runden, wurde das Säulenvolumen der Hauptsäule auf 250  $\mu\text{l}$  vergrößert, während das Volumen der Vorsäule in allen folgenden Runden konstant bei 100  $\mu\text{l}$  gehalten wurde. In der ersten Runde wurden 2,3 nmol des hybridisierten RNA-Pools, entsprechend durchschnittlich 1,4 Kopien pro Sequenz, mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf die Säule aufgetragen und mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen. Durch anschließendes Waschen mit 1 ml Elutionspuffer wurden die Disulfidbrücken gespalten und das Peptid mit der spezifisch bindenden RNA eluiert. Das Peptid wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt, die RNA mit Ethanol gefällt und in cDNA revers transkribiert, durch PCR amplifiziert und für die nächste Runde in RNA transkribiert. In der ersten Runde konnte die Komplexität des Pools bereits so weit herab gesetzt werden, daß in allen weiteren Runden nur noch 500 pmol renaturierte RNA mit einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  auf die Säule aufgetragen wurden. Außerdem wurde das Säulenbettvolumen der Hauptsäule auf 100  $\mu\text{l}$  verringert und nur noch mit 2 ml Bindungspuffer gewaschen. Bei beiden Selektionen wurde ein Anstieg der spezifisch eluierten RNA in der 4. Runde beobachtet. Nach der 8. Runde konnte die Selektion abgebrochen werden, da kein weiterer Anstieg der spezifisch eluierten RNA beobachtet werden konnte (Abb. 10 u. Tab. 1).



**Abb. 10:** Anteil der spezifisch eluierten RNA je Selektionsrunde. Die hellen Balken stellen den Anteil der RNA dar, der durch Waschen mit DTT mit dem  $\beta\text{A4}(1-16)$  von der Säule eluiert wurde. Die dunklen Balken entsprechen der eluierten RNA der  $\beta\text{A4}(1-40)$ -Selektion.

Selektions- runde	$\beta$ A4(1-40)			$\beta$ A4(1-16)		
	RNA [%]	Vorsäule [%]	Hauptsäule [%]	RNA [%]	Vorsäule [%]	Hauptsäule [%]
1	0,03	0,5	1,1	0,02	1,3	0,7
2	0,04	1,3	1,0	0,09	5,9	2,4
3	0,15	4,4	1,7	0,06	1,9	1,8
4	4,5	3,1	2,8	0,78	2,9	2,3
5	7,3	5,0	4,2	7,8	4,3	2,9
6	12,7	7,2	4,8	14,5	14,2	3,3
7	19,7	9,3	4,0	16,4	16,3	4,0
8	19,9	8,7	4,9	16,6	11,8	2,1

**Tabelle 1: Elutionsergebnisse der einzelnen Selektionsrunden.** In der zweiten Spalte sind die spezifisch von der Hauptsäule eluierten RNA-Mengen angegeben, während die dritte und vierte Spalte die auf den Säulen haftende RNA-Menge angeben.

Auffällig ist, daß der Anteil der auf der Vorsäule bindenden RNAs von Runde zu Runde zunimmt, obwohl in jeder Runde eine Vorsäule verwendet wurde (Tabelle 1). Ebenfalls ansteigend ist der Anteil der RNA, der nicht von der Vor- und Hauptsäule eluiert werden kann. Dies ist jedoch ein Phänomen, das bei vielen Selektionen zu beobachten war (Klußmann, 1996; De Beuckelar, 1998). Es wurde untersucht, ob die Aufarbeitung der RNA nach der Transkription bei diesen Phänomenen eine Rolle spielt, z. B. durch Bildung von Aggregaten während des De- oder Renaturierungsschritts. Dazu wurde eine Selektionsrunde parallel mit unterschiedlich aufgearbeiteter RNA durchgeführt und die Werte der eluierten RNA und der an der Säule haftenden RNA miteinander verglichen. Während bei dieser Selektion die RNA vor dem Auftragen auf die Säule in jeder Runde für 5 min bei 90 °C denaturiert und über einen Zeitraum von 20 min wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und renaturiert wurde, sollte untersucht werden, ob ein sofortiges Herunterkühlen durch auf Eis Stellen der Probe zu einer Veränderung führt. Dies würde bedeuten, daß es während des langsamen Abkühlens zu einer Oligomerbildung kommen könnte, die durch ein schnelles Abkühlen verhindert wird.

Außerdem wurde die RNA ohne eine Aufreinigung über ein Gel und der Ethanolfällung über eine Nap-Säule von niedermolekularen Beimengungen (NTPs, Salze) befreit und ohne eine Hybridisierung direkt auf die Säule aufgetragen, um zu untersuchen, ob das Denaturieren der RNA einen Einfluß auf die weiteren Schritte hat. Bei allen drei Selektionsversuchen wurden jedoch die gleichen Werte erhalten.



## 4.3 Charakterisierung der Aptamere

Die Eluate nach der achten Selektionsrunde wurden revers transkribiert und durch PCR amplifiziert. Man erhält so ein Gemisch aus Aptamersequenzen, die für eine Analyse separiert werden müssen. Durch Klonierung in kompetenten Bakterienzellen, die genau ein DNA-Plasmid aufzunehmen vermögen, und anschließendes Ausstreichen auf einer Agarplatte erhält man einzelne Kolonien, die eine Aptamersequenz enthalten. Für die Transformation wurde die DNA in den pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene) ligiert. Dieser Vektor enthält ein Gen für Ampicillinresistenz sowie einen *lac* Promotor. Nach Transformation des Vektors in *Epicurian Coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>Kan Zellen wurden die Zellen auf Agarplatten mit X-Gal, IPTG und dem Antibiotikum Ampicillin ausgestrichen. Aufgrund des Ampicillins können nur transformierte Zellen wachsen, wobei sich jene mit einem Vektor ohne Insert aufgrund des X-Gals und des intakten  $\beta$ -Galactosidase-Gens blau färben. Es wurden zu jeder Selektion etwa 100 weiße Klone ausgewählt und die Plasmide isoliert. Sequenziert wurden die Inserts nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977), wobei ein Teil radioaktiv mit <sup>35</sup>S und ein Teil unter Verwendung eines ABI-Sequencers sequenziert wurde. Durch Verwendung des Universalprimers und des reversen Primers wurden beide Stränge des Inserts sequenziert. Insgesamt wurden für das  $\beta$ A4(1-40) und das  $\beta$ A4(1-16) jeweils 75 Proben sequenziert.

### 4.3.1 Sequenzanalyse

#### Primärstruktur

Die Primärstrukturen des randomisierten Bereichs der Aptamere, bestehend aus etwa 70 Nukleotiden, wurden auf homologe Bereiche untersucht. Die Existenz von konservierten Bereichen kann Aufschluß geben, welche Nukleotide an einer Bindung an das Zielmolekül beteiligt sind. Es wurde ein Computerprogramm geschrieben, das die Suche nach gleichen Motiven unterschiedlicher Länge durchgeführt hat. Die 75 ermittelten Sequenzen der Selektion gegen das  $\beta$ A4(1-40) können in 5 Gruppen eingeteilt werden, die für sich in hohem Maße konserviert sind (Abb. 11). 13 der 75 Sequenzen können in keine der Gruppen eingeteilt werden und besitzen auch untereinander keine konservierten Regionen. In alle anderen Sequenzen ist das Motiv b1 mit bis zu 11 Basen vertreten (Tabelle 2). Drei weitere Motive die in einem Großteil der Sequenzen auftreten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Motiv-Nr.	konserviertes Motiv	verschiedene Gruppen	Anzahl der Sequenzen	Sequenzen [%]
b1	CACCGUAAGGA	5	62	83
b2	CGGCUUGUUUCCC	4	52	69
b3	AAGUGUA	3	33	44
b4	CAUG..UC.UGCA	2	32	43

**Tabelle 2: Häufigkeit der konservierten Motive der Sequenzen der Selektion gegen  $\beta$ A4(1-40).**

Wie bei den Sequenzen für das  $\beta$ A4(1-40) können auch die Sequenzen der Aptamere gegen das  $\beta$ A4(1-16) in Gruppen eingeteilt werden, die sehr stark konserviert sind (Abb. 12). Anders als bei den Sequenzen der  $\beta$ A4(1-40)-Selektion gibt es nur ein Motiv, das in mehr als zwei Gruppen auftritt. Das Motiv a1 mit 9 Basen tritt jedoch in über der Hälfte der Sequenzen auf (Tabelle 3). Es wurden fünf weitere Motive aus 6 bis 11 Basen gefunden.

Motiv-Nr.	konserviertes Motiv	verschiedene Gruppen	Anzahl der Sequenzen	Sequenzen [%]
a1	UGAGGCCCC	2	37	51
a2	CGCAUG	3	32	44
a3	CCCGAG	2	29	40
a4	AAGUACCGUAA	2	25	35
a5	CUUCCG	2	25	35
a6	CAACAA	2	10	14

**Tabelle 3: Häufigkeit der konservierten Motive der Sequenzen der Selektion gegen  $\beta$ A4(1-16).**



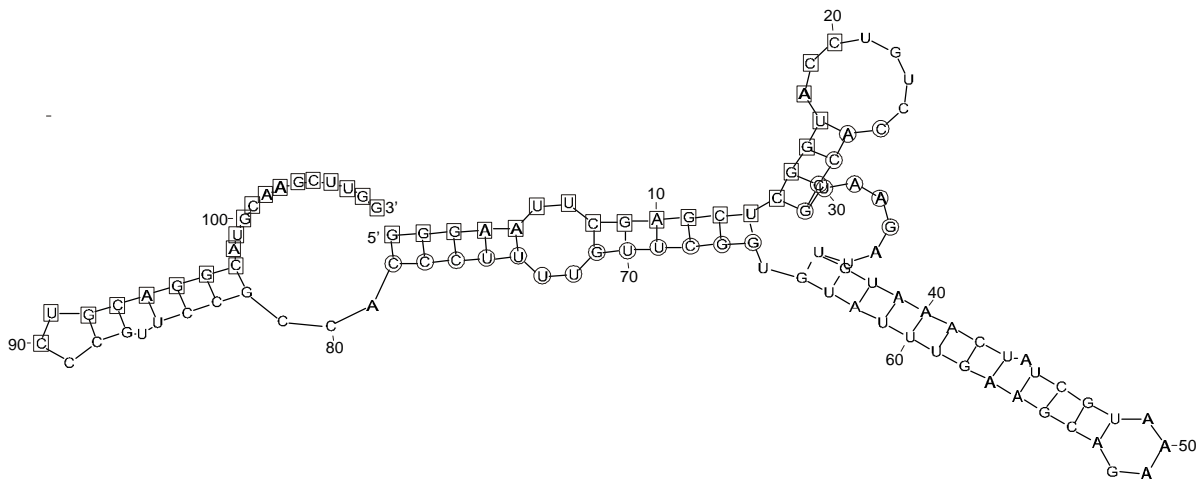
**Abb. 11: Sequenzen der Selektion gegen  $\beta$ A4(1-40).** Konservierte Bereiche sind fett und unterstrichen dargestellt. Lücken, die sich dadurch ergeben, daß die Motive untereinander geschrieben wurden, sind durch Punkte aufgefüllt. Sequenzen von denen die Dissoziationskonstante bestimmt wurde, sind durch ein Sternchen gekennzeichnet.

<b>Gruppe 1</b>	a1	5'	UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCC . UACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>	-3'		
	a4*		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>			
	a6		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	G . AAACUUGU . GCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a7		UCUGAUCCAGC	<u>AAGCACCGAAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>			
	a20		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a21		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	G . AAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a28		UCUGAUCCAGC	<u>AAGCACCGUAA</u>	GGAAACUUGUGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>			
	a34		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGUGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a48		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCAUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a56		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGUGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>	UCUG		
	a62		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGUGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCCG</u>	AU	<u>CCCGAGU</u>			
	a84		UCUGAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>			
	a86		UCUAAUCCAGC	<u>AAGUACCGUAA</u>	GGAAACUUGGGGCUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCGAGU</u>			
	a87		UCUGAUCCAGC	<u>AAGCACCGUAA</u>	GGAAACUUGG . . CUCCCUACAAGUUCGGCUUGU	<u>CUUCC</u>	CAU	<u>CCCGAGU</u>			
<b>Gruppe 2</b>	a14		UCCGAUUCGA	<u>CUUCCG</u>	.....CCAAC	<u>CAACAA</u>	ACCCACUUGUUAUUG	<u>AAGUA</u>	<u>CGUAA</u>	CCUUCAAUGC	<u>.AUGCC</u>
	a18*		UCCGAUUCGA	<u>CUUCCG</u>	.....CCAAC	<u>CAACAA</u>	AUCCACUUGUUAUUG	<u>AAGUA</u>	<u>CUUAA</u>	CCUUCAAUGC	<u>CGAUGC</u>
	a71		UCCGAUUCGA	<u>CUUCCG</u>	.....CCAAC	<u>CAACAA</u>	ACUCACUUGUUAUUG	<u>AAGUA</u>	<u>CGUAA</u>	CCUUCAAUGC	<u>CGAUGC</u>
	a80		UCCGAUUCGA	<u>CUUCCG</u>	.....CCAAC	<u>CAACAA</u>	ACCCACUUGUUAUUG	<u>AAGUA</u>	<u>CGUAA</u>	CCUUCAAUGC	<u>CGAUGC</u>
	a81		UCCGAUUCGA	<u>CUUCCG</u>	.....CCAAC	<u>CAACAA</u>	ACCCACUUGUUAUUG	<u>AAGUA</u>	<u>CGUA</u>	CCUUCAAUGC	<u>CGAUGC</u>
<b>Gruppe 3</b>	a24		ACCGCGCU	<u>CGCAU</u>	UGUUGUGUACUUCUACA	<u>CAACAA</u>	UGAUGAUUCA	<u>GAGGCCCC</u>	UGACCAUGC	UA	
	a36*		CCCACCGCGCU	<u>CGCAU</u>	UGUUGUGUACUUCUACA	<u>CAACAA</u>	UGAUGAUUCA	<u>UGAGGCCCC</u>	UGACCAUGC	UA	
	a79		CCUACCGCGCU	<u>CGCAU</u>	UGUUGUGUACUUCUACA	<u>CAACAA</u>	UGAUGAUUCA	<u>UGAGGCCCC</u>	UGACCAUGC	UA	
<b>Gruppe 4</b>	a39		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	GGG	<u>GAG</u>	CGUAAUUCGUAACGUCU
	a44		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGC</u>	.....	U	<u>GAG</u>	CGUAAUUCGUAACGUCU	
	a53*		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	<u>CCCGAG</u>	CGUAAUUCGUAACGUCU	
	a82		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAUUAUAGUUACACAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	<u>CCCGAG</u>	CGUAAUUCGUAACGUCU	
	a46		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	<u>CCC</u>	CCUUU . <u>GCAUG</u>	UUUGCGACC
	a13		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	.....	<u>CCC</u>	CCUUUUU	<u>GCAUG</u>	UCAUAAC
	a59*		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	AAAAAU	<u>GCAUG</u>	AUCU . GCUGU
	a67		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCCCC</u>	A	.....	AAAAAU	<u>GCAUG</u>	AUCU . GCUGU
	a2		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GNAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a8		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	.....	UGAAC	<u>CGCAUG</u>	UGCU . GCAUAAAU	
	a31		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	.....	CUAU	<u>GCAUG</u>	CUCUAGCAUUUCGU	
	a38		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUAGAAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GCAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a54*		UCACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GCAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a61		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GCAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a68		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	.....	GACCCUUU	<u>GCAUG</u>	U . UUGCGACC	
	a69		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GCAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a70		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GAAACCCGUUU	<u>CGCAUG</u>	U . CUUG . AU	
	a11		GCACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	.....	CUCCUUU	<u>GCAUG</u>	CUCUGCUCUCA	
	a16		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAGGCC</u>	A	.....	ACAUGACCAUUC	<u>CGCAUG</u>	U . CUC
	a19		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	UAACGUUG	<u>CGCAUG</u>	U . CU . GUGUUA	
	a65		ACACCUAGCUC	.....	GGUUGUCUACGGCAAUAGUUACAAC	<u>UGAAGCC</u>	.....	GCAA . . . . .	<u>GCAUG</u>	U . CUUGCUUACAU	

**Abb. 12: Sequenzen der Selektion gegen  $\beta$ A4(1-16).** Konservierte Bereiche sind fett und unterstrichen dargestellt. Gleiche Motive wurden, sofern es möglich war, untereinander geschrieben oder durch unterschiedliche Unterstreichungen gekennzeichnet. Lücken, die sich dadurch ergeben, daß die Motive untereinander geschrieben wurden, sind durch Punkte aufgefüllt. Sequenzen von denen die Dissoziationskonstante bestimmt wurde, sind durch ein Sternchen gekennzeichnet.

### Sekundärstruktur:

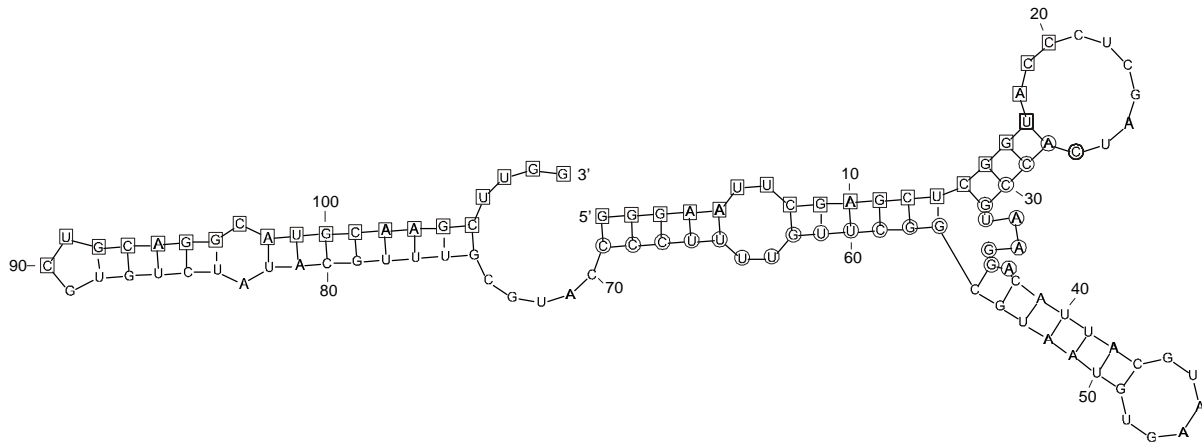
Die Aptamere gegen das  $\beta$ A4(1-40) wurden auch hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur analysiert, wobei die Sekundärstrukturmodelle mit Hilfe des Computerprogramms RNADraw berechnet wurden (Matzura & Wennborg, 1996). Erwartungsgemäß zeigte sich, daß innerhalb einer Familie die Strukturen der Aptamere ähnlich sind. In den Abbildungen 13-16 sind die Strukturen einiger Aptamere aus unterschiedlichen Familien dargestellt. Beim Vergleich der Strukturen fällt auf, daß das Motiv b2 (Tabelle 2) bei allen Aptameren mit dem Anfang des Primer A basengepaart auftritt. Da nicht alle Basen des Motivs komplementär zum Primer sind, tritt ebenfalls in jeder Struktur ein Loop auf. Dies läßt vermuten, daß diese Stem-Loop-Region entscheidend für die Wechselwirkung mit dem Amyloid ist. Dabei besitzt der Stamm vermutlich nur eine stabilisierende Funktion, während eine Bindung an das Peptid über die ungepaarten Basen des Loops stattfinden könnte. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß bei allen Sequenzen immer vier Uridine bzw. drei Uridine und ein Cytidin diesen Loop bilden. Beim Aptamer  $\beta$ 61 in Abbildung 13 sind dies die Basen U6, U7, U72 und U73.



**Abb. 13: Sekundärstruktur des Aptamers  $\beta$ 61.** Basen der Primer sind durch Quadrate, konservierte Basen durch Kreise gekennzeichnet.

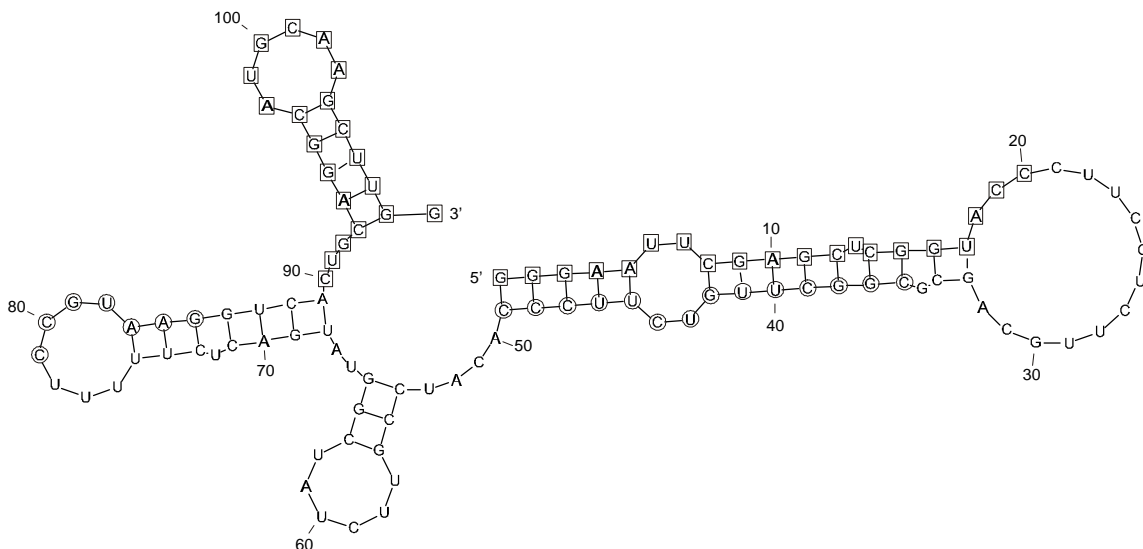
Obwohl zu einer anderen Gruppe gehörig, ähnelt das Aptamer  $\beta$ 124 dem  $\beta$ 61 sehr. Neben dem Primer-gepaarten Motiv und dem Loop findet man bei beiden auch noch einen Hairpin mit der Basenfolge AAG (Abb. 13, A50-G52, Abb. 14, A46-G48).

Während die Anordnung des Motivs b2 in allen Sequenzen ähnlich ist, sind die Gemeinsamkeiten beim Motiv b1 nicht so eindeutig zu erkennen. Zwar tritt bei der Sequenz des  $\beta$ 61 wie auch beim  $\beta$ 124 die ungepaarte Basenreihenfolge UAAG auf (Abb. 14, C32-G35),



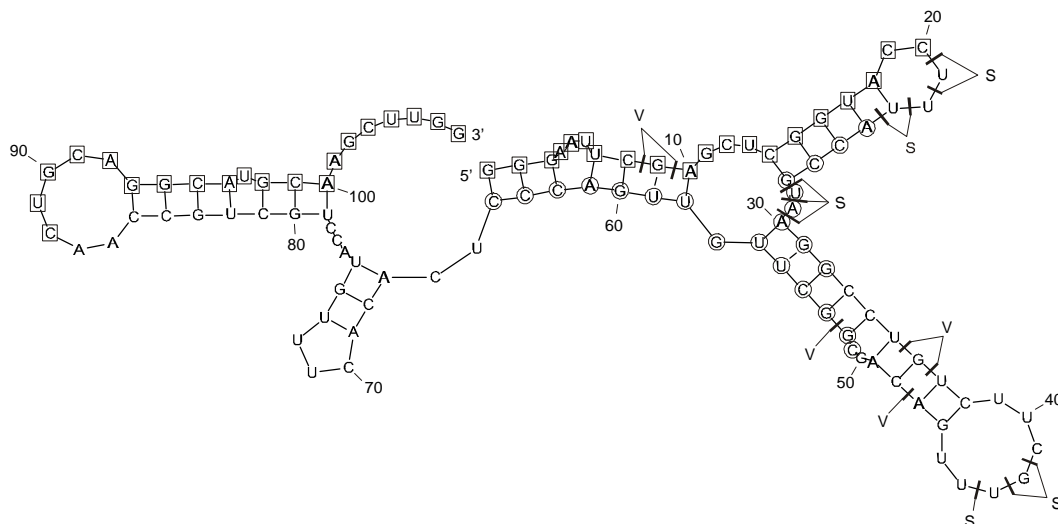
**Abb. 14: Sekundärstruktur des Aptamers  $\beta$ 124.** Basen der Primer sind durch Quadrate, konservierte Basen durch Kreise gekennzeichnet.

auf (Abb. 14, C32-G35), doch sind bei anderen Sequenzen diese Basen gepaart. Dennoch scheint dieses Motiv bei der Bindung des Peptids eine Rolle zu spielen, da ein Aptamer,  $\beta$ 19, gefunden wurde, in dem die Reihenfolge der Motive b1 und b2 vertauscht ist (Abb. 15). In der Nähe des 5'-Endes liegt das Motiv b2, daß auch hier wieder mit dem Primer A basengepaart vorliegt, während das Motiv b1 nahe des 3'-Endes angeordnet ist. Eine strukturelle Ähnlichkeit dieses Bereichs mit den anderen Aptameren ist jedoch nicht ohne weiteres ersichtlich.



**Abb. 15: Sekundärstruktur des Aptamers  $\beta$ 19.** Basen der Primer sind durch Quadrate, konservierte Basen durch Kreise gekennzeichnet.

Das Aptamer  $\beta 55$ , mit der niedrigsten Dissoziationskonstante, unterscheidet sich etwas stärker von den Strukturen der anderen Aptamere, obwohl auch hier wieder die Motive b1 und b2 vorzufinden sind (Abb. 16).



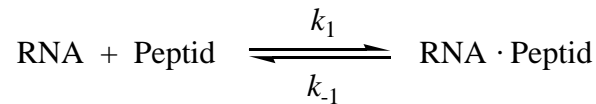
**Abb. 16: Sekundärstruktur des Aptamers  $\beta 55$ .** Basen der Primer sind durch Quadrate, konservierte Basen durch Kreise gekennzeichnet. Die mit V und S markierten Bindungen konnten durch RNase-V<sub>1</sub> bzw. -S<sub>1</sub> oder -T<sub>2</sub> gespalten werden.

Im Gegensatz zu den anderen Strukturen sind hier weniger Basen mit dem Primer A gepaart. Auch der Loop aus den vier Pyrimidinen tritt in dieser Form nicht auf. Stattdessen existiert ein Loop aus den drei Basen AAU. In dem Motiv b1 liegen auch nur zwei Basen U-A (Abb. 16, U28, A29) einzelsträngig vor, was bedeuten könnte, daß diese beiden Basen an der Bindung des Peptids beteiligt sind. Auffällig ist, das bei allen vier vorgestellten Strukturmodellen die letzten drei Basen des Primers in einen Hairpin hineinragen. Da diese Basen jedoch konserviert sind, muß es sich nicht um ein bedeutendes Strukturmerkmal handeln. Das Strukturmodell dieses Aptamers wurde durch enzymatische Spaltung mit RNasen genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde die RNA am 3'- bzw. 5'-Ende radioaktiv markiert und unter Verwendung verschiedener spezifisch spaltender Nukleasen einer limitierten nukleolytischen Hydrolyse unterzogen. Verwendet wurden die Einzelstrang-spezifischen Nukleasen Ribonuklease T<sub>2</sub> und Nuklease S<sub>1</sub>, die Doppelstrang-spezifische Ribonuklease V<sub>1</sub> sowie die Guanosin-spezifische Ribonuklease T<sub>1</sub>.

Der Vergleich der Strukturen legt die Vermutung nahe, daß das 3'-Ende der Aptamere bis zu den Basen des Motivs b2 nicht essentiell ist für die Bindung des Peptids.

### 4.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Bindung eines Aptamers an sein Target und damit die Bildung eines Komplexes kann als eine Gleichgewichtsreaktion betrachtet werden, die durch folgende Gleichung beschrieben werden kann:



$k_1$  bezeichnet hier die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Komplexes und  $k_{-1}$  die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Komplexes. Nach dem Massenwirkungsgesetz kann man die Bildung des Komplexes und damit die Affinität der RNA zu dem Peptid durch die Assoziationskonstante  $K_a$  oder ihren reziproken Wert, der Dissoziationskonstante  $K_d$ , beschreiben. In der Literatur wird für die Affinität von Makromolekülen üblicherweise die Dissoziationskonstante  $K_d$  mit der Dimension mol/l (M) verwendet.

$$K_d(\text{Peptid}) = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\text{Peptid}] \cdot [\text{RNA}]}{[\text{RNA} \cdot \text{Peptid}]}$$

Die meisten Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante beruhen auf einer Konzentrationsbestimmung des Komplexes bei bekannter RNA- und Peptidkonzentration. Von einer Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Gleichgewichtsdialyse wurde in dieser Arbeit aufgrund der hohen Tendenz des  $\beta$ A4(1-40) zur Aggregation abgesehen. Außerdem wird für die Gleichgewichtsdialyse radioaktiv markiertes Peptid benötigt. Nach einer chemischen Markierung des Amyloid ist es jedoch nicht mehr möglich, Aussagen über dessen Konformation zu machen. Stattdessen wurde versucht, die Bindungskonstante über Filterbindungs-Assay zu bestimmen. Dazu wurde eine Lösung aus radioaktiv markierter RNA und Peptid durch einen Nitrocellulose-Membranfilter filtriert, der das Peptid bzw. den Peptid-RNA-Komplex zurückhalten sollte. Obwohl zwei Membranen mit unterschiedlicher Porengröße (0,1 und 0,2  $\mu\text{m}$ , Protran BA79 u. BA83, Schleicher & Schüll) verwendet wurden, konnte das Peptid nicht quantitativ zurückgehalten werden. Weiterhin wurden Mobility-Shift-Assays zur Bestimmung der Bindungskonstante herangezogen, bei denen man sich das unterschiedliche Laufverhalten der RNA und des Komplexes auf einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld zunutze machen will. Unter den Versuchsbedingungen konnte jedoch keine Bildung des Komplexes beobachtet werden. Die Ursache hierfür könnten die von der Selektion abweichenden Versuchsbedingungen während der Elektrophorese bzw. ein Zerfall des Komplexes während der Elektrophorese sein.



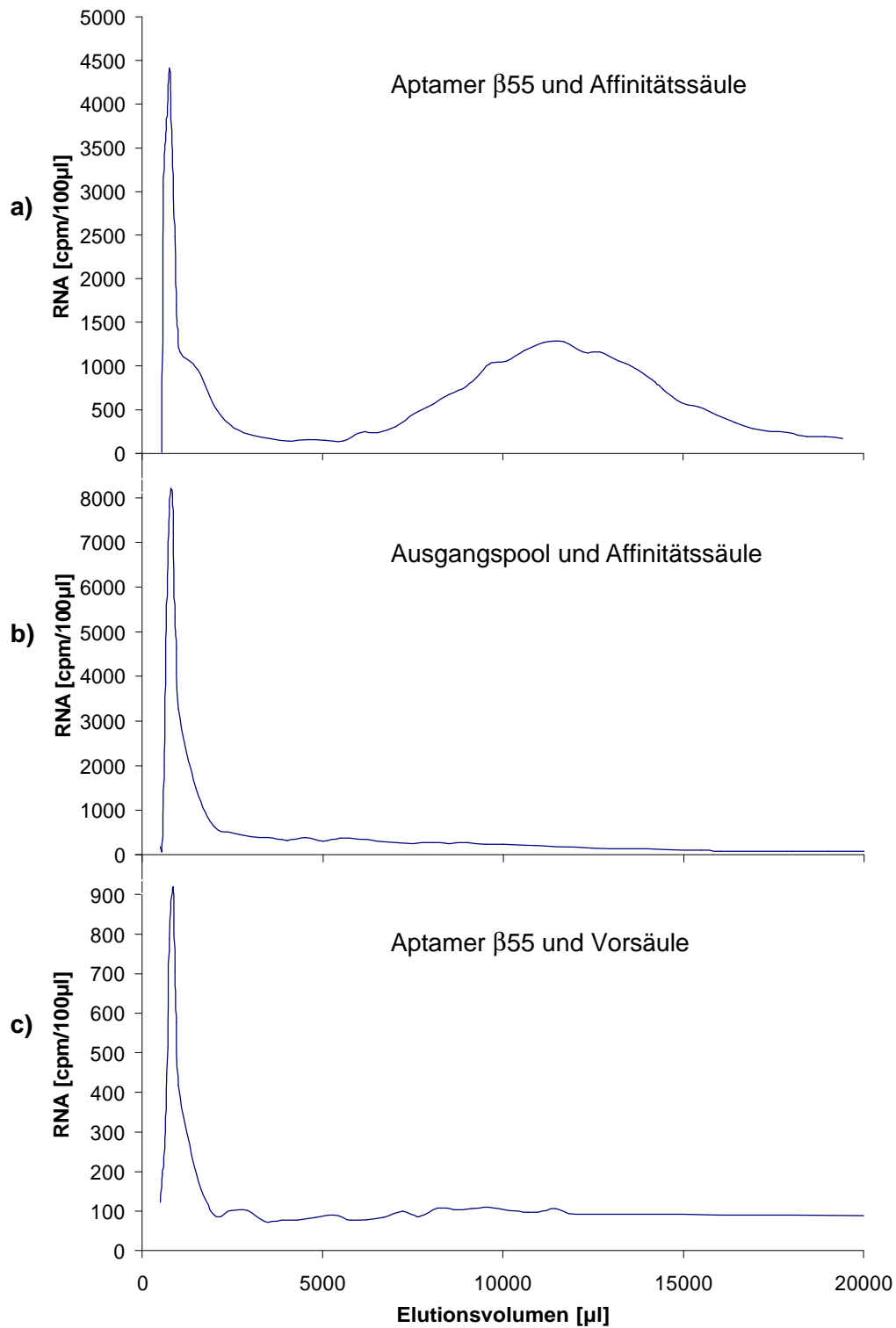
Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten die apparenten Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Bei dieser Methode macht man sich das Gleichgewicht zwischen freier und gebundener RNA zunutze, indem man durch Waschen mit Bindungspuffer die RNA von der Säule eluiert. Je stärker die RNA an das Peptid bindet, desto später wird die RNA von der Säule eluiert. Das Elutionsvolumen ist daher ein Maß für die Bindungskonstante in Abhängigkeit von der Säulengröße sowie der Beladung der Säule mit dem Peptid und läßt sich nach folgender Gleichung berechnen (Famulok & Szostak, 1992, Sassanfar & Szostak, 1993):

$$K_d = \frac{L \cdot (V_c - V_0)}{V_{el} - V_0}$$

L: Konz. des Liganden auf der Säule  
 $V_c$ : Volumen der Säule  
 $V_{el}$ : Elutionsvolumen der RNA  
 $V_0$ : Totvolumen der Säule

Damit diese Gleichung gültig ist, muß das Säulenvolumen im Verhältnis zum Volumen der aufgetragenen RNA möglichst groß sein, damit wie bei einer säulenchromatographischen Aufreinigung die RNA in einer schmalen Bande durch die Säule läuft. Außerdem sollte die Konzentration der RNA-Lösung kleiner sein als die zu erwartende Bindungskonstante, um die Gleichung innerhalb ihres Gültigkeitsbereichs anzuwenden und so den Fehler der Dissoziationskonstante möglichst klein zu halten (Arnold *et al.*, 1986). Daraus folgt, daß die RNA sehr stark radioaktiv markiert sein muß, damit selbst kleinste Mengen im fmol-Bereich noch detektiert werden können. Es wurde mit Mikrosäulen des Econo-Systems (Bio-Rad) gearbeitet, die sich durch einen geringen Querschnitt auszeichnen. 10 µl einer 100 nM RNA-Lösung wurden auf eine Säule mit einem Säulenbettvolumen von 800 µl aufgetragen und kontinuierlich mit Hilfe einer Pumpe eluiert. Das Elutionsprofil des Aptamers β55 ist in Abb. 17a dargestellt. Der scharfe Peak zu Beginn der Elution ist vermutlich auf fehlerhaft gefaltete RNA zurückzuführen, die nicht mit dem Peptid interagieren kann. Diesen Peak kann man zur Bestimmung des Totvolumens  $V_0$  verwenden. Um das Totvolumen möglichst genau zu bestimmen, wurde zu Beginn der Elution ein sehr kleines Fraktionsvolumen gewählt, während später deutlich größere Fraktionen gesammelt wurden. Um die Aktivitäten der unterschiedlich großen Fraktionen vergleichen zu können, wurden die Daten auf ein konstantes Volumen von 100 µl normiert.

Um zu zeigen, daß es sich um eine spezifische Anreicherung von bindenden Aptameren handelt, wurde zum Vergleich ein Elutionsprofil des randomisierten RNA-Pools aufgenommen (Abb. 17b). Wie zu erwarten konnte hier keine Retardierung der RNA beobachtet werden.



**Abb. 17: Elutionsprofile zur Bestimmung der Dissoziationskonstante.** Das obere Diagramm (a) stellt das Elutionsprofil des Aptamers  $\beta$ 55 auf einer Affinitätssäule dar, während im mittleren Diagramm (b) das Elutionsprofil der RNA nach der ersten Selektionsrunde dargestellt ist. Die Elution des Aptamers  $\beta$ 55 von einer unbeladenen Vorsäule ist im unteren Diagramm (c) dargestellt.

Versuche, die Dissoziationskonstante durch kompetitive Elution mit Bindungspuffer, der freies Amyloid enthält, zu bestimmen, waren nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür könnte eine Aggregation des Peptids auf dem Säulenmaterial oder eine vom immobilisierten Peptid abweichende Konformation des löslichen Amyloids sein. Als freies Peptid wurde *in vitro*-synthetisiertes, lösliches Amyloid verwendet, während auf dem Säulenmaterial chemisch synthetisiertes  $\beta$ A4 immobilisiert wurde. Von der Verwendung von chemisch synthetisiertem Peptid für die Competitionselution wurde abgesehen, da gezeigt wurde, daß die Konformation von Synthese zu Synthese variieren kann (Howlett *et al.*, 1995).

Durch den Einsatz einer Vorsäule mit unbeladenem Trägermaterial in allen Selektionsrunden sollte eine Anreicherung von Säulenmaterial-affinen RNAs bereits verhindert worden sein. Um dennoch sicherzustellen, daß es sich bei den selektierten RNAs um Peptid-bindende Aptamere handelt, wurde ein Elutionsprofil der RNA auf einer Vorsäule aufgenommen. Da bei der Elution der RNA von der Vorsäule keine Retardierung beobachtet werden konnte (Abb. 17c), kann geschlossen werden, daß es sich um Aptamere gegen das Amyloid handelt.

Die Dissoziationskonstanten von vier Aptameren gegen das  $\beta$ A4(1-40) konnten auf diese Weise bestimmt werden (Tabelle 4). Da die verwendete RNA-Konzentration um den Faktor 5 größer ist als die beste Dissoziationskonstante, muß ein Fehler einkalkuliert werden, so daß die wirklichen Dissoziationskonstanten vermutlich etwas größer sind.

Obwohl die RNA vollständig von der Säule eluiert wurde, wurde das Säulenmaterial nach maximal drei Bestimmungen ausgewechselt, da keine Retardierung der RNA mehr festgestellt werden konnte. Dadurch wurde das Säulenmaterial zur limitierenden Größe, und es konnten nicht mehr Proben vermessen werden.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Aptamere gegen das  $\beta$ A4(1-16) wurde analog durchgeführt. Hier konnte allerdings nur eine bindende Sequenz gefunden werden.

$\beta$ A4(1-40)		$\beta$ A4(1-16)	
Aptamer	app. $K_d$ [nM]	Aptamer	app. $K_d$ [nM]
$\beta$ 55	29		
$\beta$ 61	37	$\alpha$ 4	758
$\beta$ 19	39		
$\beta$ 37	48		

**Tabelle 4: Apparente Dissoziationskonstanten der Aptamere.**