Selektion und Charakterisierung von Aptameren, spezifisch für das Virus der Infektiösen Bursitis

Der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg eingereichte

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

vorgelegt
von Tierärztin Sabine Kainz
geboren am 19. September 1976 in Lienz / Österreich
Hamburg, den 29.12.2005

Universität Hamburg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2002 bis Februar 2003 am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und in der Zeit von März 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, der Universität Hamburg durchgeführt.

Die letzte mündliche Prüfung fand am Freitag, den 3. Februar 2006, statt. Gutachter der Dissertation waren Prof. Dr. Ulrich Hahn, Prof. Dr. Peter Heisig und Dr. Edzard Spillner.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung 1

1.1 Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) 1
1.1.1 Pathogenese der Infektiösen Bursitis 1
1.1.2 Virusstruktur 3
1.1.3 Antigene Eigenschaften 6
1.1.4 Vakzine 7

1.2 Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) und Aptamere 8
1.2.1 Aptamere 8
1.2.2 Aptamere in der Biomedizin 15

1.3 Zielstellung der Arbeit 16

2 Material 17

2.1 Technische Ausrüstung 17

2.2 Verbrauchsmaterial 18

2.3 Chemikalien 18

2.4 Puffer und Medien 19

2.5 Enzyme, Längenstandards und Kits 20

2.6 Oligonucleotide, Nucleotide und Radiochemikalien 21

2.7 Hühnereier, Vektoren, Bakterienstämme, und Antikörper 21

2.8 Virus 22

2.9 Software 22

3 Methoden 23

3.1 Allgemeine Methoden 23

3.2 Analytische Trennung und Reinigung von Nucleinsäuren 23
3.2.1 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese 23
3.2.2 Nachweis von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid 23
3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen 24
3.2.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese 24
3.2.5 Nachweis von RNA in Gelen mit UV-Shadowing 25
3.2.6 Diffusionselution von RNA aus Polyacrylamidgelen 25
3.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion 25
3.2.8 Ethanolfällung 25
3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen 26

3.3 Präparation von Nucleinsäuren ... 26
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 26
3.3.2 *In vitro*-Transcription ... 28
3.3.3 Reverse Transcription (RT) ... 29
3.3.4 Ligation ... 30
3.3.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen ... 30
3.3.6 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen ... 31
3.3.7 Plasmidpräparation ... 31
3.3.8 DNA-Sequenzierung ... 31
3.4 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung und Reinigung von rekombinantem viralen Protein ... 32
3.4.1 Herstellung von VP2, Teil I ... 32
3.4.2 Herstellung von VP2, Teil II ... 34
3.4.3 Produktion und Reinigung von VP2 in *E.coli*-Zellen ... 35
3.5 Analyse von rekombinantem, gereinigten VP2 ... 36
3.5.1 Photometrische Analyse der gereinigten Fraktionen ... 36
3.5.2 Analyse der gereinigten Fraktionen mittels SDS-PAGE ... 36
3.6 Methoden zur Herstellung und Reinigung von Virus ... 38
3.6.1 Herstellung von Saatvirus ... 38
3.6.2 Reinigung des Saatvirus mittels CsCl-Gradienten ... 39
3.6.3 Plaquereduktionstest ... 39
3.6.4 Inaktivierung gereinigter Viruspartikel durch UV-Licht ... 40
3.7 Selektion mittels Kapillarelektrophorese ... 40
3.7.1 Vorbereitende Experimente ... 40
3.7.2 Darstellung von RNA durch Kapillarelektrophorese ... 41
3.7.3 Darstellung der Zielmoleküle durch Kapillarelektrophorese ... 41
3.7.4 Durchführung einer Selektion mittels Kapillarelektrophorese ... 42
3.8 Filterbindungstests ... 43
3.8.1 Dephosphorylierung von RNA unter Verwendung von CIAP ... 43
3.8.2 Radioaktive Markierung von RNA ... 44
3.8.3 Vorbereitung der markierten Nucleinsäure ... 44
3.8.4 Inkubation von RNA und Target ... 44
3.8.5 Filterbindungstest mit RNA und Target, bzw. Kontrollen ... 45
3.8.6 Messung der Radioaktivität mittels Szintillationszähler ... 45
3.9 Plaquereduktionstests ... 45
3.9.1 Herstellung der Zellkultur ... 45
3.9.2 Stabilitätstest von Nucleinsäuren ... 46
3.9.3 Virusneutralisationstests ... 46

4 Ergebnisse und Diskussion 48

4.1 Herstellung und Reinigung der Zielmoleküle 48
4.1.1 Vermehrung und Reinigung des Virus 48
4.1.2 Plaquereduktionstest zum Nachweis der Virusinaktivierung 48
4.1.3 SDS-PAGE zum Nachweis der Reinheit der Viruspräparation 49
4.1.4 Gentechnische Produktion und Reinigung von VP2 in *E.coli* 49

4.2 Herstellung des RNA-Pools 55

4.3 Vorbereitung des RNA-Pools 57

4.4 Inkubation der Zielmoleküle mit der RNA-Bibliothek 57
4.4.1 Inkubation von RNA-Pool und Virus 57
4.4.2 Inkubation von RNA-Pool und VP2 57

4.5 Selektion mittels Kapillarelektrophorese 57
4.5.1 CE-SELEX für IBDV 57
4.5.2 CE-SELEX für VP2 63

4.6 Charakterisierung selektierter Aptamere 66
4.6.1 Charakterisierung der virusbindenden RNA-Moleküle 66
4.6.2 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach CE-SELEX für Virus 69
4.6.3 Charakterisierung der VP2-bindenden Moleküle nach zwei Runden CE-SELEX 75
4.6.4 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach zwei Runden CE-SELEX für VP2 78
4.6.5 Charakterisierung der VP2-bindenden Aptamere nach drei Runden CE-SELEX 79
4.6.6 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach drei Runden CE-SELEX für VP2 80
4.6.7 Virusneutralisationstests mit den selektierten Aptameren 90-26 und 3-1 84

4.7 Ausblick 88

5 Zusammenfassung 90

6 Conclusions 91

7 Literaturverzeichnis 92

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CE	*capillary electrophoresis*
°C	Grad Celsius
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CIAP	*calf intestinal alkaline phophatase*
cpm	*counts per minute*
$CsCl_2$	Cäsiumchlorid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dsRNA	*double stranded RNA*
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FBT	Filterbindungstest
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalie Virus
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
K_2HPO_4	Kaliumhydrogenphosphat
kV	Kilovolt
LB	Luria Broth
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
MOI	*moiety of infection*
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
NaAc	Natrumacetat
NaCl	Natriumchlorid

Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
$(NH_4)_2SO_4$	Ammoniumsulfat
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm gemessen
ORF	*open reading frame*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynucleotidkinase
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
rpm	*rounds per minute*
s	Sekunde
ssDNA	*single stranded DNA*
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SELEX	*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*
SPF	spezifisch pathogenfrei
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Thermus Aquaticus*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Tris-Natriumchlorid-Sodiumdodecylsulfat
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNT	Virusneutralisationstest
VP	Virales Protein
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

1 Einleitung

1.1 Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV)

1.1.1 Pathogenese der Infektiösen Bursitis

Bei der infektiösen Bursitis (*infectious bursal disease*, abgekürzt "IBD") handelt es sich um eine virale Erkrankung, von der vor allem Hühner im Alter von drei bis sechs Wochen betroffen sind. Erstmals beschrieben wurde diese hochkontagiöse Krankheit 1962, damals entstand das Synonym "Gumboro disease", welches auf den Namen der Stadt Gumboro im Bundesstaat Delaware (USA) mit den ersten Ausbrüchen von IBD zurückzuführen ist.
Weltweit verursacht IBD immense wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie und gilt daher in Deutschland als meldepflichtige Tierkrankheit bei Puten und Hühnern. Aus diesem Grund besteht ein hoher Bedarf an einer Grundimmunisierung, die durch verschiedene Formen der Vakzinierung gewährleistet werden kann.
Eine Infektion mit dem Virus der Infektiösen Bursitis (abgekürzt "IBDV") ist durch einen zyklischen Verlauf gekennzeichnet (Müller et al., 1979), der zunächst mit der hauptsächlich oralen Aufnahme des Erregers beginnt. Das Virus vermehrt sich nun in darmassoziierten Makrophagen und gelangt im Rahmen einer primären Virämie über den Blutstrom in die Bursa Fabricii (BF) (Käufer und Weiss, 1980), wo es zu einer massiven Virusvermehrung kommt. Infolgedessen tritt eine sekundäre Virämie und erneute Replikation in anderen lymphatischen Organen wie Thymus, Milz, Zäkaltonsillen und Knochenmark auf. Durch beide Virämien erfolgt eine Überflutung des Körpers mit Viren, produziert in körpereigenen Zellen, ohne dass natürliche Abwehrmechanismen greifen können. Ohne das Eingreifen des körpereigenen Immunsystems wird dieses somit umgangen, was als Ursache für die Entwicklung klinischer Symptome angesehen (Cursiefen et al., 1979; Käufer und Weiss, 1980).
Neben der Zerstörung der B-Zellen kann auch ein Effekt auf die zelluläre Immunantwort beobachtet werden, bei dem Störungen der Funktion von T-Helfer-Zellen und die Aktivierung und Vermehrung von Suppressorzellen auftreten (Lam, 1998; Sharma und Fredericksen, 1987; Sharma und Lee, 1983). Eine weitere tragende Rolle in der Pathogenese spielt die Einwanderung von T-Zellen in die BF, die maßgeblich an der Beseitigung des Virus und der Regeneration der BF beteiligt sind. Allerdings setzten diese Zellen unter anderem Zytokine frei und verursachen zytotoxische Effekte, welche die Schädigung des bursalen Gewebes zusätzlich verstärken und die Wiederbesiedlung des Organs mit B-Zellen verzögern (Rautenschlein et al., 2002).

Es sind verschiedene Krankheitsverläufe bekannt, die vom Alter der Tiere und dem damit verbundenen Entwicklungsstand des primären lymphatischen Organs BF abhängig sind. Dadurch lässt sich die extreme Empfänglichkeit von drei bis sechs Wochen alten Hühnern erklären, da zu diesem Zeitpunkt die BF beim Geflügel maximal entwickelt ist. Tiere, die von einer akuten Erkrankung befallen sind, zeigen deutliche klinische Symptome wie Apathie, Appetitlosigkeit, Erschöpfung und Durchfall (Cosgrove, 1962). Pathologisch-anatomisch ist eine charakteristische Schwellung der BF zu erkennen, die oft mit hämorrhagischen Entzündungsherden korreliert. Bei Fortschreiten der IBD führt die Nekrose der Lymphfollikel zur Atrophie des gesamten Organs (Cheville, 1967) und somit durch die damit einhergehende B-Zell-Defizienz zu einer allgemeinen Immunschwäche (Allan et al., 1972). Küken, die unter drei Wochen alt sind und mit IBD infiziert sind, weisen keinerlei klinische Symptome auf (Hitchner, 1971). Auf subklinischer Ebene resultieren allerdings Mikroläsionen in der BF (Winterfield et al., 1972), die wiederum zu der beschriebenen Immunsuppression führen. Folgeerkrankungen dieser sekundären Immunschwäche sind eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber fakultativ pathogenen Erregern und oftmals das Unvermögen, nach Impfungen ausreichend schützende Antikörper zu bilden (Faragher, 1974).

IBDV weist gemeinsame Strukturmerkmale mit dem Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) der Salmoniden, dem Oyster Virus (OV), dem Tellina tenius Virus (TV) der Mollusken sowie dem Drosophila X Virus (DXV) auf. Diese Viren gehören zu der Familie der *Birnaviridae* (*bi*segmented *RNA*), wobei IBDV innerhalb dieser Familie dem Genus *Avibirnavirus* zugeordnet werden kann (Pringle, 1998).

Isolate aus dem Atmungstrakt von Puten wiesen Strukturmerkmale von IBDV auf, verursachten aber keine auffälligen Veränderungen in der BF (Müller und Nitschke, 1987a). Unter natürlichen und experimentellen Bedingungen waren diese Isolate für Hühner und Puten apathogen. Mit Hilfe von Serumneutralisationstests konnten die apathogenen Virusstämme von den hühnerpathogenen Isolaten unterschieden und zum Serotyp 2 zusammengefasst werden. Alle pathogenen Stämme gehören dem Serotyp 1 (McFerran, 1980) an und können aufgrund ihrer Virulenz und antigenen Variation weiter unterteilt werden. So unterscheidet man beispielsweise innerhalb des Serotyp 1 klassisch virulente IBDV-Stämme (*virulent*, abgekürzt "v-IBDV-Stämme"), Variantstämme und hochvirulente IBDV-Stämme (abgekürzt "hv-IBDV-Stämme") wie in Bild 1-1 aufgeführt.

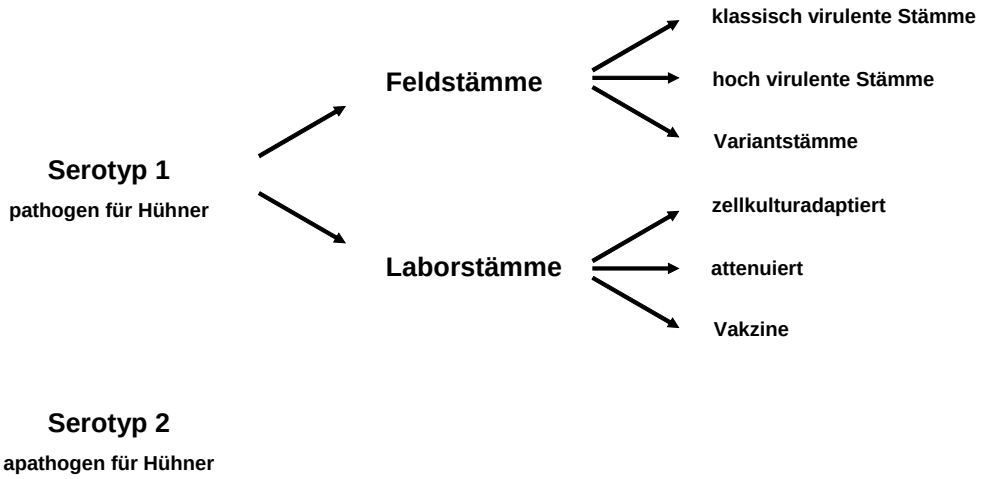

Bild 1-1: Darstellung der verschiedenen IBDV-Stämme

Bis in die Mitte der 80er Jahre konnte die IBD durch attenuierte Lebendvakzine und Totvakzine kontrolliert werden, wobei weltweit erneut von Krankheitsausbrüchen berichtet wurde (Müller et al., 1992). In den USA wurden bisher unbekannte IBDV-Stämme isoliert, die antigene Varianten des Serotyp 1 darstellten und in der Lage waren, den Impfschutz der Hühner zu durchbrechen (Jackwood et al., 1987; Snyder et al., 1992). Diese Variantstämme traten z.B. auch in Mittelamerika, Asien und Australien auf. Ende der 80er Jahre konnten in Europa (Brown et al., 1994; Eterradossi et al., 1992) akute Fälle von IBD beobachtet werden, die allerdings von den hv-IBDV-Stämmen hervorgerufen wurden, welche die gleichen Antigeneigenschaften wie die v-IBDV-Stämme aufwiesen (Van der Marel et al., 1990). Die beschriebenen hv-Stämme treten heutzutage ebenfalls in vakzinierten Betrieben auf und verursachen Mortalitätsraten von bis zu 100 %. Ein weiteres Charakteristikum ist ihre ausschließliche Anzucht in Hühnern oder in embryonierten Hühnereiern, nicht jedoch in Zellkulturen. Die auf allen Kontinenten verbreiteten hv-IBDV-Stämme stellen eine erhebliche Bedrohung für die Geflügelindustrie dar, was nicht zuletzt aus der Tatsache resultiert, dass derzeit verfügbare Impfstoffe keinen absolut sicheren Schutz vor Infektionen bieten.

1.1.2 Virusstruktur

Die unbehüllten IBDV-Partikel besitzen eine ikosaedrische Form und einen Durchmesser von ca. 60 nm (Nick et al., 1976). Ihr Genom besteht aus zwei Segmenten doppelsträngiger RNA (dsRNA), die je nach Stamm auf eine Größe von 3200 bis 3400 Basenpaaren (bp) bei Segment A und 2750 bis 2900 bp bei Segment B geschätzt werden (Azad et al., 1985; Müller und Nitschke, 1987a; Müller und Nitschke, 1987b). Dabei ist das Segment A des deutschen Stammes Cu-1 3261 bp und das Segment B desselben Stammes 2827 bp lang (Kibenge et al., 1996). Bild 1-2 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Viruspartikels.

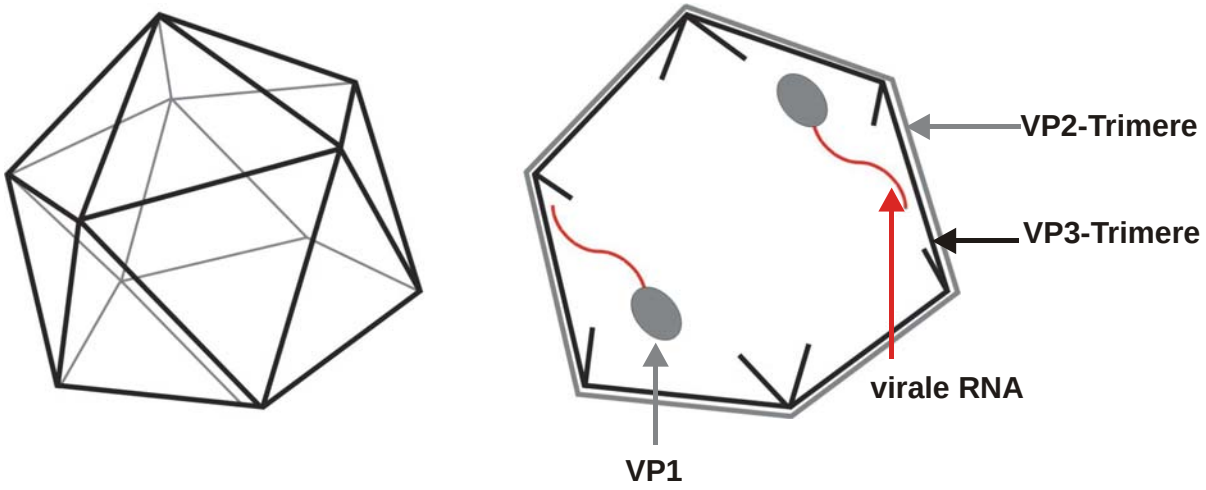

Bild 1-2: Schematische Darstellung eines IBDV-Partikels

Das Segment A kodiert in einem großen offenen Leserahmen (*open reading frame, ORF*) ein Polyprotein (VP0) von ca. 108 Kilodalton (kDa), das die Virusproteine (VP) in der Reihenfolge N-VP2-VP4-VP3-C enthält, wie in Bild 1-3 gezeigt (Hudson et al., 1986).

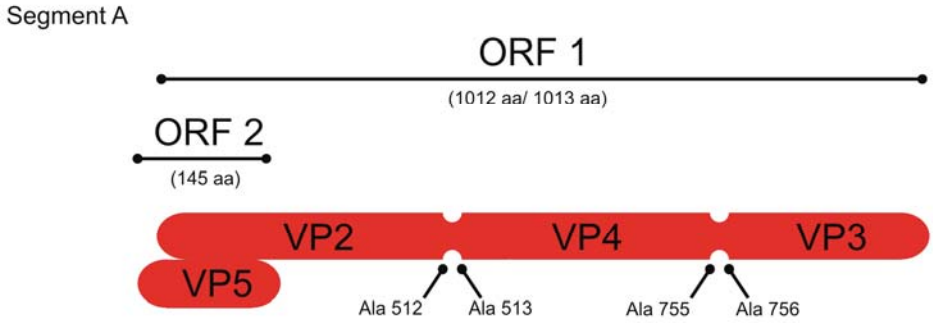

Bild 1-3: Genomische Organisation des Segments A des IBDV-Stammes Cu-1

Die Strukturproteine werden in einem zweistufigen, proteolytischen Spaltprozess aus dem Polyprotein hergestellt, wobei in einem ersten Schritt das Polyprotein in ein 45 bis 50 kDa großes Vorläuferprotein (VP2a) und ein 55 bis 60 kDa großes Protein (VP4-VP3) gespalten wird (Müller und Becht, 1982). Durch carboxyterminale Abspaltung eines 4 kDa großen Fragments von VP2a entstehen VP2b (40 bis 45 kDa), welches überwiegend in reifen Partikeln vorkommt (Öppling et al., 1991) und vier kleinere Peptide, von denen bisher drei ebenfalls im reifen Virion nachgewiesen wurden. VP3 (30 bis 32 kDa) und VP4 (28 kDa) gehen aus dem zweiten 55 bis 60 kDa großen Vorläuferprotein hervor (Bild 1-4).

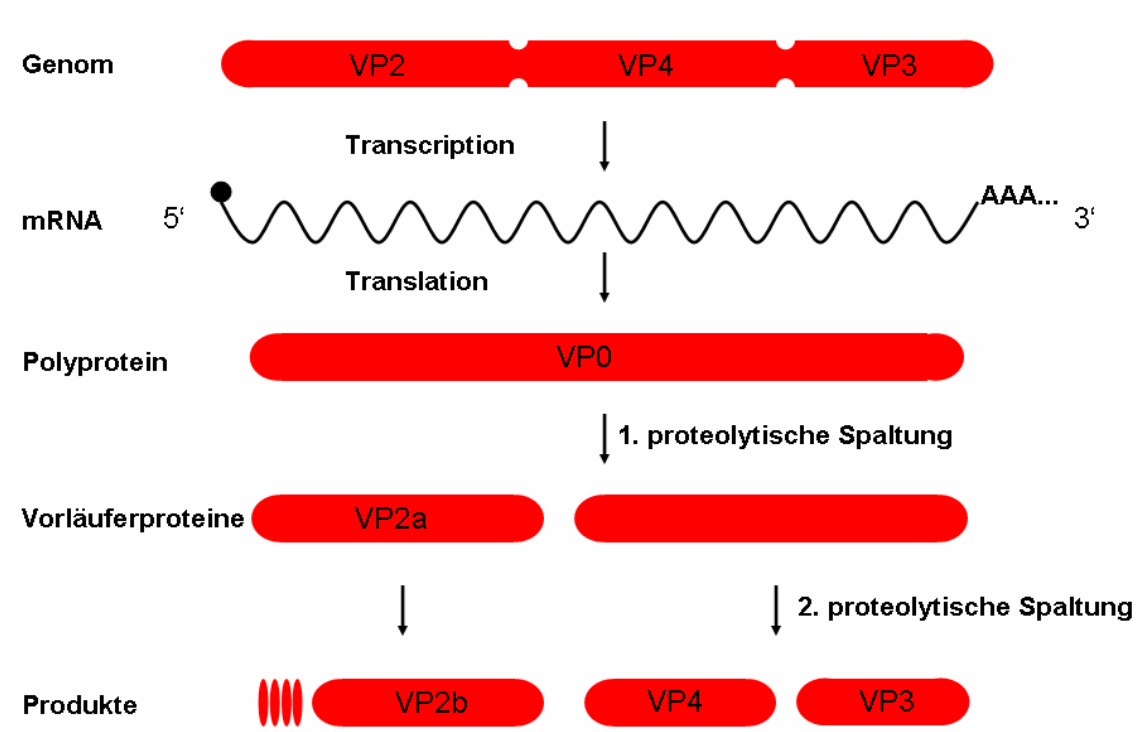

Bild 1-4: Darstellung der proteolytischen Spaltprozesse und Reifung der viralen Proteine

VP4 nimmt eine Sonderstellung im Spaltungsprozess des Polyproteins ein, da es über eine autokatalytische Proteaseaktivität verfügt (Lejal et al., 2000). Die für die Prozessierung notwendigen Spaltstellen im Polyprotein konnten durch gerichtete Mutagenese ermittelt werden und liegen für VP2-VP4 zwischen den Aminosäuren Ala512-Ala513, bzw. für VP4-VP3 zwischen Ala755 und Ala756 (Sanchez und Rodriguez, 1999). Die beiden Strukturproteine VP2 und VP3 bilden gemeinsam über 90 % des gesamten Proteingehalts des Virus (Dobos et al., 1979), wobei VP2-Homotrimere für die Bildung der äußeren Oberfläche, VP3 für die der inneren Oberfläche der Virione verantwortlich sind (Martinez-Torrecuadrada et al., 2000). So sind bezüglich des immunologisch interessanteren VP2 in etwa 11.400 Kopien auf der Oberfläche eines einzigen Virus zu finden.

Der zweite auf dem Segment A vorhandene ORF überlappt teilweise mit dem ersten und kodiert ein 16 kDa großes Protein, VP5 (Kibenge et al., 1990). Dieses Protein wurde bisher nur in der Zellmembran IBDV-infizierter Zellen nachgewiesen. VP5 scheint aufgrund seiner Fähigkeit, *in vitro* Apoptose zu induzieren (Lombardo et al., 2000), eine Rolle in der viralen Pathogenese und in der Freisetzung von IBDV-Partikeln aus infizierten Zellen zu spielen (Yao und Vakharia, 2001).

1.1.3 Antigene Eigenschaften

In den Anfängen der IBDV-Forschung wurde angenommen, dass VP3 für die Entstehung neutralisierender Antikörper verantwortlich ist. Dies Annahme beruht auf der Tatsache, dass nach einer IBDV-Infektion zuerst große Mengen an Antikörpern gegen VP3 gebildet werden und erst später VP2-spezifische Antikörper nachweisbar sind (Fahey et al., 1985). Allerdings gelang es nicht, neutralisierende Antikörper gegen rekombinant hergestelltes, bzw. aus Polyacrylamidgelen isoliertes, VP3 zu produzieren (Becht et al., 1988). VP3 weist also lediglich sero- und gruppenspezifische Epitope auf, die nicht konformationsabhängig sind (Mahardika und Becht, 1995).

Es ist eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern (mAk) mit neutralisierenden Eigenschaften bekannt, die alle gegen VP2 gerichtet sind. Becht et al. (Becht et al., 1988) konnten zeigen, dass neutralisierende mAk lediglich die native Form von VP2, nicht jedoch das denaturierte Protein erkennen, und leiteten daher ab, dass konformationsabhängige Epitope für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern verantwortlich sein müssen. Zudem wurde die Bindung dieser mAk bis auf ein 145 Aminosäuren (AS) umfassendes Sequenzfragment eingeengt (Azad et al., 1987). In vergleichenden Untersuchungen der Sequenzen unterschiedlicher virulenter IBDV-Stämme wurde bewiesen, dass in dieser Region des Proteins (AS 206 bis AS 350) eine starke Variabilität auf Nucleinsäure- und Aminosäureebene besteht (Bayliss et al., 1990). Dieser Bereich wird als hypervariable Region von VP2 bezeichnet und ist durch sein stark hydrophobes Zentrum charakterisiert, welches von zwei hydrophilen Bereichen flankiert wird. Eingehende Analysen mit IBDV-Escape-Mutanten lassen auf drei voneinander unabhängige Epitope in dieser Region rückschließen, die alle an der Bildung neutralisierender Antikörper beteiligt sind (Schnitzler et al., 1993). Die Selektion der Escape-Mutanten sowie weitere Sequenzanalysen von VP2 verschiedener IBDV-Stämme haben bestätigt, dass dieser variable Bereich die molekulare Grundlage für antigene Variationen in den einzelnen Stämmen darstellt (Vakharia et al., 1994). Gegen VP2 gerichtete Antikörper sind serotypspezifisch, wobei noch mindestens ein gruppenspezifisches Epitop vorhanden ist. Dieses gruppenspezifische Epitop induziert jedoch keine neutralisierenden Antikörper.

1.1.4 Vakzine

Die Bekämpfungsproblematik von IBDV resultiert aus der hohen Infektiösität und Resistenz gegenüber Inaktivierung. Ein striktes Impfregime ist wegen des hohen Infektionsdruckes und der schwer durchführbaren hygienischen Maßnahmen unabdingbar. Um in Jungtieren hohe Titer von maternalen Antikörpern, die während der Legeperiode persistieren, zu induzieren, werden die Legehennen mit inaktivierten Vakzinen geimpft. Nach dem Schlupf werden die Hühner mit Lebendimpfstoffen immunisiert, wobei der Zeitpunkt der Vakzination sehr entscheiden ist, da eventuell persistierende maternale Antikörper den Impfstoff neutralisieren könnten. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass vvIBDV-Stämme Immunitäten, die durch attenuierte Virusstämme hervorgerufen wurden, durchbrechen können. Würde man allerdings statt der attenuierten Viren weniger abgeschwächte Stämme zur Impfung benutzen, könnte man dadurch Läsionen in der Bursa Fabricii hervorrufen. Infolgedessen könnte eine Immunsuppression in geimpften Tieren hervorgerufen werden.
Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über bereits entwickelte Vakzine, deren immunogene Wirksamkeit zwar bestätigt ist, die jedoch noch nicht kommerziell erhältlich sind. Eine Weiterentwicklung dieser und andersartiger, neuer Impfstoffe könnte zur Produktion von kostengünstigen, effektiven und sicheren Vakzinen führen.

Tabelle 1-1: Beispiele für Vakzine gegen IBDV (in Anlehnung an Müller et al., 2003)

Impfstofftyp		Referenz
Immunkomplex		(Whitfill et al., 1995)
Rekombinantes IBDV		
Vektoren	Pockenvirus	(Shaw und Davison, 2000)
	Herpesvirus	(Darteil et al., 1995)
	Adenovirus	(Francois et al., 2004)
	Togavirus	(Phenix et al., 2001)
Rekombinantes VP2		(Dybing und Jackwood, 1998; Pitcovski et al., 1996; Vakharia et al., 1993; Wang et al., 2003)
Virusähnliche Partikel (VLP)		(Hu et al., 1999; Kibenge et al., 1999)
DNA		(Chang et al., 2003; Fodor et al., 1999)

1.2 Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) und Aptamere

Der Begriff "Evolution" (*evolvere* – entwickeln) wurde 1774 von dem Schweizer Naturforscher Albrecht von Haller geprägt. Zu seiner Zeit bezeichnete er mit diesem Synonym die menschliche Entwicklung. Heute hat diese Definition in allen Bereichen der Naturwissenschaften eine immense Bedeutung eingenommen. Eine allgemein gefasste Erklärung des Evolutionsbegriffs besagt, dass es sich hierbei um das fortlaufende Entstehen und das Wachsen bereits entstandener Muster in Hinblick auf aufsteigende Komplexizität handelt. Dabei ändert sich der für die Evolution zur Verfügung stehende Ausgangspool ständig und schafft somit neue Voraussetzungen für die Entstehung von beispielsweise neuen Strukturen. Auf diese Art und Weise ist die Entwicklung des Lebens nachzuweisen, wie sie von C. Darwin postuliert wurde. Vor allem Darwins Publikationen legten den Grundstein der modernen Evolutionstheorie, wie sie heute gültig ist. Damals wie heute findet neben dem natürlichen auch ein durch den Menschen hervorgerufener, künstlicher Evolutionsprozess statt, mit dem Ziel der Züchtung von Individuen mit speziellen Eigenschaften. Im breit gefächerten Bereich der Biochemie und Molekularbiologie finden Eingriffe in den Selektionsprozess u. a. im Gebiet der Proteine mittels "Phagen *Displays*" (Smith, 1985) oder mittels "Ribosomen *Displays*" (Hanes und Plückthun, 1997) statt. Innerhalb des letzten Jahrzehnts konnte sich aber ebenso die Evolution von Nucleinsäuren, insbesondere von RNA-Molekülen etablieren (Tuerk und Gold, 1990).

1.2.1 Aptamere

Nucleinsäure-Moleküle sind, ähnlich wie Proteine, in der Lage, definierte Strukturen auszubilden. Die Eigenschaft führt zu einer hochaffinen und spezifischen Bindung von diversen Liganden oder zu katalytischen Reaktionen. Das Vermögen von Nucleinsäuren, verschiedenste Konformationen einzunehmen, hängt von ihrer Basensequenz ab. Mögliche Strukturen sind in Bild 1-5 dargestellt. Diese dreidimensionalen Strukturen der Nucleinsäuren führen dazu, dass sie ebenso gut an Proteine, Viren oder andere zelluläre Bestandteile binden können, wie deren Bindungspartner und zudem eine hohe Stabilität aufgrund von Strukturbesonderheiten aufweisen können (Kainz et al., in press).

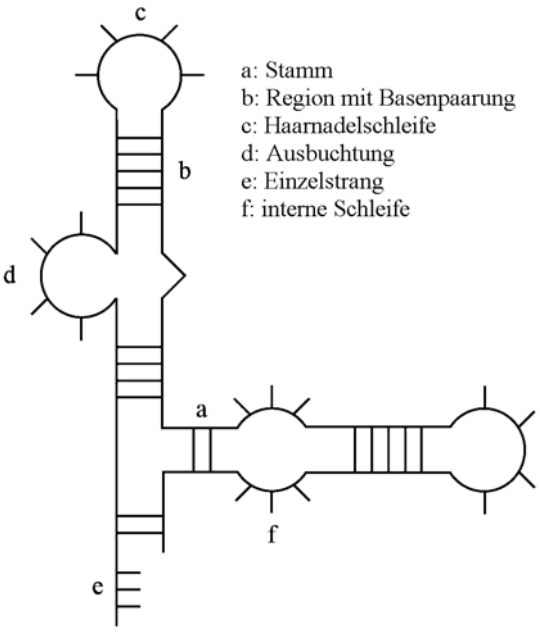

Bild 1-5: Beispiele für mögliche RNA-Sekundärstrukturen

Die von den komplexen Strukturen abhängige Bindungskapazität der RNA-Moleküle kann mit Hilfe der in den 90er Jahren entwickelten SELEX-Technologie (Ellington und Szostak, 1990; Tuerk und Gold, 1990) ausgenutzt werden, wobei SELEX für "**S**ystematische **E**volution von **L**iganden durch **EX**ponentielle Anreicherung" steht. Nucleinsäuren, die in der Lage sind, Zielmoleküle spezifisch zu binden, werden „Aptamere“ genannt und können mit Hilfe von SELEX identifiziert werden. Im Allgemeinen handelt es sich bei einem SELEX-Experiment um eine Anreicherung von Aptameren, ausgehend von einer synthetischen, kombinatorischen Bibliothek von bis zu 10^{16} individuellen Sequenzen. Durch einen wiederholten Kreislauf von Selektion bindender RNA-Moleküle, Abtrennung nicht bindender Sequenzen sowie enzymatischer Amplifikation der mit dem Zielmolekül interagierenden RNA-Liganden erhält man üblicherweise Sequenzen, die sehr spezifisch und hochaffin an ihren Liganden binden. Die Ausgangsbibliothek enthält für gewöhnlich einen Bereich von 20 – 220 randomisierten Nucleotiden (Bartel und Szostak, 1993), welcher von konstanten Bereichen, die Primerbindungsstellen darstellen, flankiert wird. Außerdem liegt im konstanten Bereich zumeist eine Promotorsequenz, die für die *in vitro*-Transcription der RNA unerlässlich ist (Beaudry und Joyce, 1992). Die einzelsträngige DNA-Ausgangsbibliothek wird typischerweise durch chemische DNA-Synthese mittels automatischer Festphasensynthese hergestellt. Der durch PCR hergestellte doppelsträngige DNA- und in RNA umgeschriebene Pool kann nun im nächsten Schritt des Selektionsprozesses mit dem gewünschten Zielmolekül unter sorgfältig ausgewählten Bedingungen inkubiert werden, was im immobilisierten Zustand oder in Lösung stattfinden kann. Durch unterschiedliche Waschschritte werden ungebundene von gebundenen Sequenzen abgeschieden. Danach erfolgt eine reverse Transcription und PCR, woraus ein Pool von RNA-Molekülen mit verbesserten Bindungseigenschaften zum Liganden resultiert. Mit diesem Schritt schließt sich der Kreislauf und wird nun für gewöhnlich acht bis zwölfmal wiederholt, bis ein gewünschtes

Aptamer erhalten wird, oder nur wenig verschiedene Sequenzen angereichert sind. Durch Klonierung und Sequenzierung resultieren nach Abschluss der systematischen Evolution monoklonale Aptamere. Als mögliche Zielmoleküle (Targets) kommen verschiedenste Moleküle wie einfache organische Verbindungen, Proteine oder ganze Zellen in Frage.

CE-SELEX

Unter dem Begriff "CE-SELEX" wird im Allgemeinen die Selektion von Aptameren mittels Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis,* CE) verstanden. Bild 1-6 zeigt den schematischen Ablauf eines solchen Selektionsprozesses.

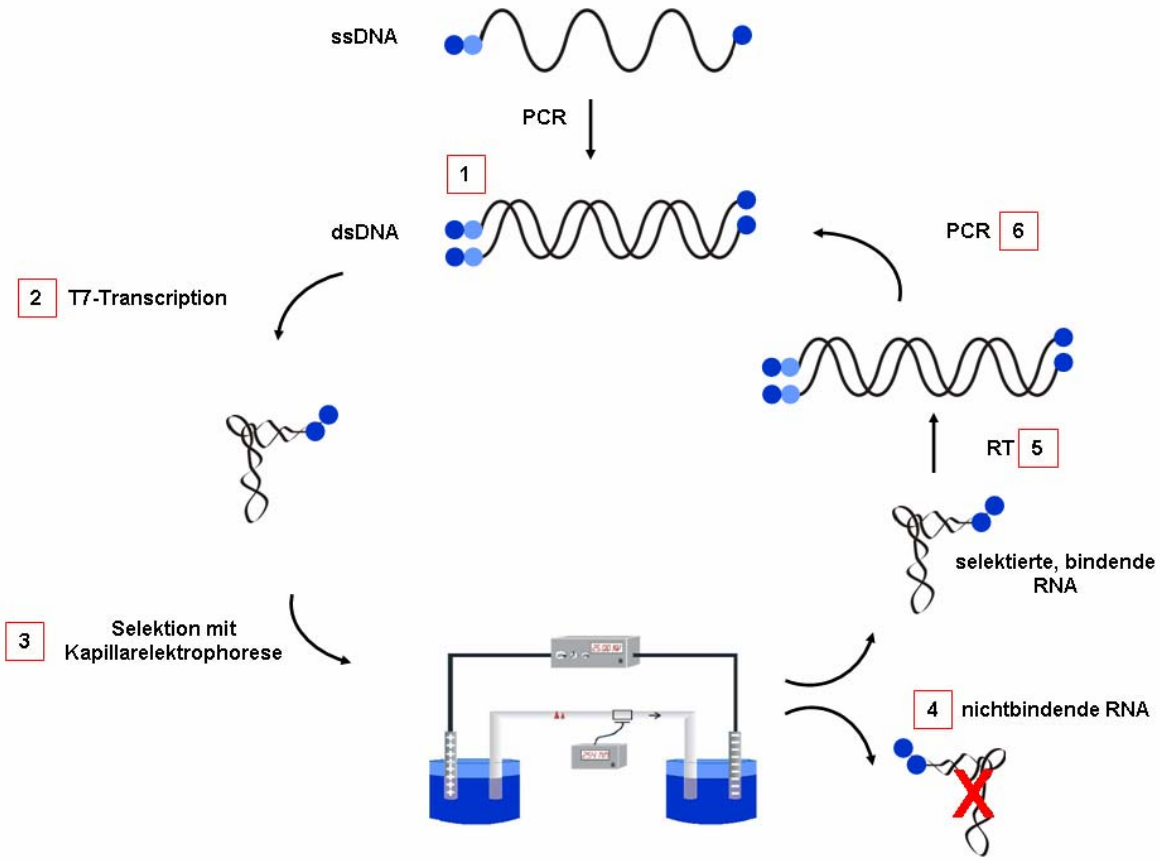

Bild 1-6: Schematische Darstellung des Selektionsprozesses mittels Kapillarelektrophorese (Erklärung siehe Text)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird aus einem synthetisch hergestellten, einzelsträngigen DNA-Pool (ssDNA) mit einer Variabilität von etwa 10^{16} unterschiedlichen Molekülen ein doppelsträngiger DNA-Pool (dsDNA) generiert. Diese Bibliothek enthält zwei Primerbindungsstellen und einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase (1). Im Rahmen einer T7-Transcription wird der dsDNA-Pool in RNA umgeschrieben (2). Nach Inkubation mit dem Zielmolekül steht der RNA-Target-Komplex für CE-SELEX zur Verfügung (3). Durch die Kapillarelektrophorese können freie RNA-Molekülen von RNA-Target-Komplexen separiert und wiedergewonnen werden (4). Die selektierten RNA-Moleküle werden über reverse Transcription (RT) in cDNA überführt (5), welche in einer anschließenden PCR vermehrt

wird (6). Diese DNA repräsentiert nun die entsprechenden Sequenzen der bindenden RNA-Moleküle und kann einem neuen Selektionszyklus zugeführt werden, um eine Anreicherung hoch spezifischer und affiner Moleküle zu erzielen.

Der allgemeine Funktionsmechanismus der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Migration geladener Teilchen in Lösung unter dem Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes und unter Verwendung einer dünnen Kapillare von 20 bis 200 µm Durchmesser (Kuhn und Hoffstetter-Kuhn, 1993). Mit dieser Methode können über kleine Ionen und Moleküle bis hin zu Peptiden, Proteinen und Oligonucleotiden die verschiedensten Stoffe separiert und analysiert werden. Der Überbegriff der CE umfasst eine große Anzahl von Systemen, die verschiedene Separationsprinzipien nutzen. Allen gemeinsam ist allerdings, dass sie auf einer der vier elektrophoretischen Methoden wie Mizellare elektrokinetische Kapillarchomatografie (MECC), Isotachophorese (ITP), Isoelektrische Fokussierung (IEF) oder Kapillarzonenelektrophorese (CZE) basieren. Die Kapillarzonenelektrophorese stellt die einfachste Form der CE dar. Ihr Separationsmechanismus basiert auf dem unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnis einzelner Moleküle. Kapillare und Pufferreservoire beider Elektroden müssen mit einer Elektrolytlösung versehen sein, die den elektrischen Strom leitet und eine gewisse Pufferkapazität besitzt. Die Probe besteht für gewöhnlich aus einer Mischung von Anionen und Kationen und wird in dieses konstante Puffersystem an einem Ende der Kapillare als anfangs scharf abgegrenzte Zone injiziert. Diese Probenzone repräsentiert den einzigen unbeständigen Bereich in dem gesamten System. Unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes, wandern die Ionen der Pufferlösung und die der aufgetragenen Probe in Richtung ihrer korrespondierenden Elektrode, die Kationen zur Kathode und die Anionen zur Anode. In den späten 80er Jahren wurde die Analyse von großen biologischen Partikeln wie beispielsweise Viren mit Hilfe der Kapillarelektrophorese entdeckt und weiter entwickelt (Hjertén et al., 1987). Da man bekanntermaßen Viren und Nucleinsäuren mittels CZE darstellen kann, ist die Anwendung von CE-SELEX in Hinsicht auf eine Isolierung von virusbindenden Molekülen viel versprechend.

Eine Besonderheit ist der so genannte elektroosmotische Fluss (EOF), der, ausgelöst durch das elektrische Feld, eine relative Bewegung einer Flüssigkeit hin zu einer fixierten, geladenen Fläche bezeichnet (Hjertén, 1967). In Folge dieses Phänomens wandern alle Teilchen in eine Richtung, ihre Mobilität unterscheidet sich nur in ihrer Geschwindigkeit, was für Separationszwecke ausreichend ist (Bild 1-7). Die deutlichsten Unterschiede zum klassischen SELEX sind vor allem die Möglichkeit der Selektion in Lösung und die absolut geringe Anzahl an für eine erfolgreiche Selektion notwendiger Zyklen. Als entscheidender Nachteil wäre aber zu erwähnen, dass nicht alle Moleküle, aufgrund ihrer für Separationszwecke ungünstigen Masse-Ladungs-Verhältnisse, für diese Art der Separation geeignet sind und die Kapillarelektrophorese deshalb in manchen Selektionen keine Anwendung findet.

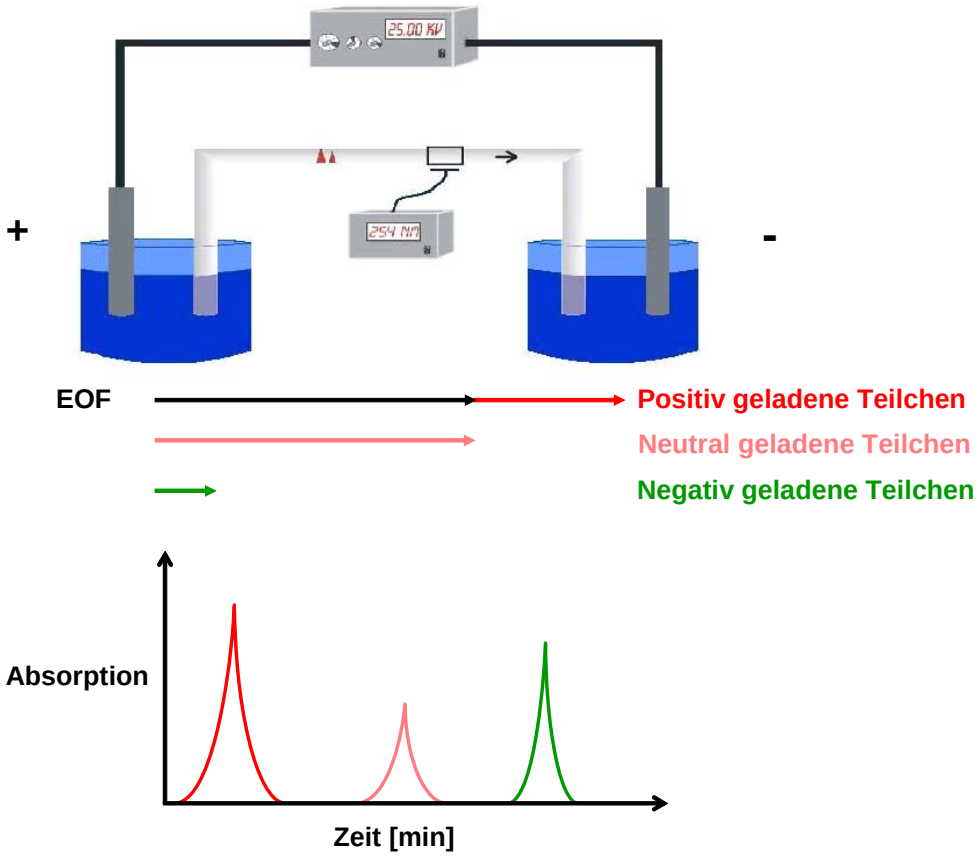

Bild 1-7: Allgemeiner Versuchsaufbau und Separationsmechanismus der CZE unter Einfluss des EOF

Zwei Puffersysteme sind durch zwei Elektroden und eine Kapillare miteinander verbunden. In die Kapillare eingegebene Moleküle wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes abhängig von ihrem spezifischen Masse-Ladungs-Verhältnis unterschiedlich. Positiv geladene Teilchen laufen in diesem Fall schneller zum negativen Pol als negativ geladene Moleküle. Der EOF trägt dazu bei, dass die positiv geladenen Teilchen in ihrer Laufgeschwindigkeit beschleunigt und die neutral und negativ geladenen Teilchen ebenfalls in Richtung Kathode, allerdings langsamer, gedrängt werden. Ein angeschlossenes Detektorsystem erfasst die Absorption der wandernden Partikel während der CE. Durch die unterschiedliche Mobilität der einzelnen Moleküle lässt sich mit Hilfe von optimal gewählten Puffer- und Temperaturbedingungen ein bestmögliches Separationsergebnis erzielen.

Mit Hilfe dieser Methode konnten in den letzten zwei Jahren erfolgreich DNA-Aptamere selektiert werden. Im Unterschied zum herkömmlichen, klassischen SELEX muss das Zielmolekül nicht immobilisiert und somit beispielsweise auch nicht durch ein Linkermolekül modifiziert werden. Filtrationstechniken für die Selektion von Aptameren benötigen zwar keine Immobilisation des Zielmoleküls, benötigen aber dennoch eine hohe Anzahl von Selektionsrunden (acht bis zwölf). Im Gegensatz dazu findet die CZE in Lösung statt und führt bereits nach zwei bis drei Runden zur Selektion von hochaffinen hochspezifischen Bindern. So konnten nach zwei Runden CE-SELEX bereits DNA-Aptamere für humanes IgE identifiziert werden (Mendonsa und Bowser, 2004). Die selbe Arbeitsgruppe konnte mit der gleichen Technik DNA-Aptamere für das Neuropeptid Y selektieren (Mendonsa und Bowser, 2005).

Aptamere als Therapeutika

Bis heute sind die meisten biopolymeren Arzneimittel Proteine, wobei sich mittlerweile eine Tendenz zur Entwicklung von kleinen, leicht zu synthetisierenden Nucleinsäuren als Inhibitoren und Modulatoren abzeichnet. Die Optimierung und Stabilisierung des Produktionsprozesses von therapeutisch anwendbaren Aptameren dauert zwar immer noch an, allerdings zeichnet sich bereits ein Fortschreiten dieser Form der Therapie ab.

Aptamere für Viren

Ein entscheidender Vorteil von Aptameren in der antiviralen Therapie gegenüber herkömmlichen Medikamenten ist die Tatsache, dass sie anscheinend nur schwach immunogen und toxigen sind, was vor allem bei immunsupprimierenden oder entzündlichen Erkrankungen eine Rolle spielt. Parasitäre Immunogene stellen oft eindeutige Ziele für die Entwicklung von Aptameren dar, wozu auch virale Lebensformen zählen. Deshalb wurde in letzter Zeit eine Anzahl von bindenden Nucleinsäuren für zahlreiche virale und pathogene Proteine selektiert, mit dem langfristigen Ziel, sie als Therapeutika einzusetzen. Viren stellen in diesem Zusammenhang ein besonderes Problem dar, weil sie eine Herausforderung für jedes Immunsystem bedeuten, vor allem wenn sie einer hohen Mutationsrate unterliegen. So ist zum Beispiel eine Variation von 9 % innerhalb der Hepatitis C Virione im Wirtsorganismus bekannt (Bukh et al., 1995). Wegen dieser auftretenden Mutationen ist das Immunsystem bei Menschen und Tieren oftmals nicht in der Lage adäquat zu reagieren, was in einer singulären oder in einer lebenslänglich persistierenden Infektion resultieren kann. Ein weiterer hervorzuhebender Vorteil von Aptameren in der Virustherapie sind ihre nahezu uniformen pharmakokinetischen Charakteristika, was eine Vereinfachung der Zusammenstellung von Kombinationstherapien ermöglicht. So könnte man beispielsweise Aptamere miteinander kombinieren, deren Bindungspartner Moleküle aller vorkommenden Phasen eines Virusvermehrungszyklus sind.

Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über derzeit medizinisch relevante Aptamere, die für Viren selektiert wurden.

Tabelle 1-2: Beispiele für medizinisch relevante Aptamere für Viren (in Anlehnung an Yan et al., 2005)

Zielmolekül	K_d (nM)	Therapeutische Anwendung	Referenz
HIV-1 reverse Transcriptase	1	HIV Replikation	(Schneider et al., 1995; Tuerk et al., 1992)
HIV-1 Integrase	10	HIV Replikation	(Schneider et al., 1995)
HIV-1 Rev	< 1	HIV Replikation	(Giver et al., 1993)
HIV-1 Tat	0,1	HIV Replikation	(Yamamoto et al., 2000)
HIV-1 Nucleocapsid	2,3	HIV Replikation	(Berglund et al., 1997)
Hepatitis C NS3	10	Virale Replikation	(Fukuda et al., 1997; Kumar et al., 1997)
Humanes Cytomegalievirus	35	Virale Replikation	(Wang et al., 2000)
Influenza Virus	n.a.	Virale Replikation	(Jeon et al., 2002)
Rous Sarcoma Virus	40	Aviäres Sarkom	(Pan et al., 1995)

Einige der ersten antiviralen Aptamere sind spezifisch für HIV, wobei sie für Proteine von HIV selektiert wurden. Die meisten dieser Aptamere zeigen einen antiviralen Effekt in der Zellkultur. So reduzieren beispielsweise anti-reverse Transcriptase Aptamere die Infektiösität von HIV in eucaryotischen Zellen um 90,0 - 99,5 % (Joshi und Prasad, 2002). Im Falle des Hepatitis C Virus, führt der Einsatz von Aptameren spezifisch für eine virale Proteasedomäne zu einer Inhibition der Proteaseaktivität von bis zu 90 % *in vitro*. Vakzine gegen Influenzaviren sind immer gegen die variablen Bereiche der Oberflächenproteine gerichtet und müssen deshalb jährlich angeglichen werden. Um diese Problematik zu umgehen, wurden Aptamere selektiert, welche die Rezeptorbindungstasche des Hämagglutinins erkennen (Jeon et al., 2002). Diese Aptamere sind in der Lage, sowohl therapeutisch, also auch prophylaktisch eine Infektion von drei verschiedenen Influenza Virusstämmen zu inhibieren (Jeon et al., 2004).

Es gibt mittlerweile auch Aptamere, die für ganze Viruspartikel selektiert wurden, was unter anderem den Vorteil hat, dass einzelne Proteine nicht mühsam identifiziert und gereinigt werden müssen und für eine Zielmolekülerkennung der native Zustand vorliegt. Am Beispiel des Rous Sarcoma Virus (RSV) führte die Behandlung mit spezifischen Aptameren konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der viralen Proteinexpression bis zu 90 %, bzw. zu einem vollkommenen Erliegen der Expression in der Zellkultur. Bei 15 bis 20 facher Konzentrationserhöhung konnte sogar eine Inhibition eines nur zu 95 % homologen RSV-Stammes erzielt werden (Pan et al., 1995). Ein anderes Virus für die Selektion von bindenden Nucleinsäuren ist das Humane Cytomegalie Virus (HCMV), wobei sich aufgrund der Vielzahl von noch nicht identifizierten Oberflächenproteinen des HCMV die Selektion

von inhibierenden Aptameren als kompliziert erwies. Trotzdem konnten Aptamere zu einer signifikanten Reduktion des viralen Titers in der Zellkultur führen (Wang et al., 2000). Sowohl die Aptamere für RSV, also auch die für HMCV wurden vor der Infektion der Zellkultur mit den jeweiligen Viren inkubiert, was nicht der erstrebten therapeutischen Anwendung entspricht.

Aptamere für nicht-virale Pathogene

Auch nicht-virale, parasitäre Lebensformen haben effektive Mechanismen entwickelt, das menschliche und animale Immunsystem zu umgehen. Die Anwendung von Antiparasitika ist oftmals aufgrund ihrer Langzeittoxizität und dem ständigen Auftreten resistenter Parasiten limitiert. Mehrere Forschungsgruppen haben bereits Aptamere für parasitäre Zielmoleküle entwickelt (Tabelle 1-3). Auch wenn diese Binder noch nicht therapeutisch einzusetzen sind, so haben sie bereits dazu beigetragen, mehr Details über parasitäre Mechanismen zu erfahren.

Tabelle 1-3: Beispiele für selektierte Aptamere für Parasiten (in Anlehnung an Yan et al., 2005)

Target	K_d (nM)	Referenz
Trypanosoma brucei (T. brucei)	60	(Homann und Goringer, 1999)
T. brucei - flagellare Tasche	30	(Homann und Goringer, 2001)
T. brucei - variables Oberflächenglycoprotein	0,3 - 0,72	(Lorger et al., 2003)
Trypanosoma cruzi (T. cruzi)	40 - 400	(Ulrich et al., 2002)

1.2.2 Aptamere in der Biomedizin

Auch wenn manche Aptamere nicht direkt in der Therapie eingesetzt werden können, so dienen sie zumindest in der Forschung dem besseren Verständnis von intra- und extrazellulären Vorgängen in den verschiedensten Organismen. Nicht nur deswegen können sie exemplarisch für neue therapeutische Anwendungen stehen. So sind zukünftige Standardapplikationen von Aptameren im Bereich der Signaltransduktion oder Genexpression längst keine Visionen mehr.

Ein Hauptargument gegen die klinische Anwendung von Aptameren ist, dass diese Binder *in vitro* selektiert werden, um sie eventuell später *in vivo* anwenden zu können, und ihre Funktionalität in jedem einzelnen Fall zunächst geklärt und bewiesen werden muss. Ferner ist beispielsweise die geeignete Applikation in den Körper oder in Zellen, die Stabilisierung der Nucleinsäuren gegenüber der enzymatischen Degradation und die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Aptameraktivität und -expression zu bedenken. Unter Beachtung dieser Argumente muss man zunächst die zwei Möglichkeiten der Aptamerapplikation beachten, welche entweder exogen oder endogen erfolgen kann, wobei natürlich auch eine Kombination beider Wege denkbar ist.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die Methode der *in vitro*-Selektion ist in den letzten Jahren ein fester Bestandteil verschiedener Verfahren zur Identifikation und Amplifikation von höchst spezifischen und affinen Molekülen geworden. In der vorliegenden Arbeit sollten die bisherigen Erfolge in der Selektion von medizinisch relevanten Aptameren auf die Separation von bindenden RNA-Molekülen für das veterinärmedizinisch bedeutungsvolle, unbehüllte IBDV ausgeweitet werden.

Bis heute kommt in der Veterinärmedizin, weder in der Diagnostik, noch in der Therapie, kein Aptamer zum Einsatz, wobei das IBDV aufgrund seines Aufbaus und seiner besonderen immunologischen Eigenschaften eine Ausnahmeerscheinung als potentielles Zielmolekül darstellt. Aufgrund dieser Merkmale sollten Aptamere mit virusneutralisierenden Eigenschaften für dieses Molekül selektiert werden. Parallel zur Selektion sollte der deutsche IBDV-Stamm Cu-1 produziert und gereinigt werden.

Um nähere Informationen über die Sonderstellung des VP2 zu erlangen, sollten ebenfalls Aptamere für das rekombinant in *E. coli* herzustellende Protein produziert werden.

Eingehende Analysen der Sequenzen, Strukturen und Bindungseigenschaften eventuell selektierter Aptamere sollten Aufschluss über den Erfolg und die Schwierigkeiten der angewandten Selektionsmethode geben.

Resultierende Aptamere könnten nähere Informationen über den Mechanismus der Neutralisation eventuelle Hinweise und Diagnostik und Therapie geben.

2 Material

2.1 Technische Ausrüstung

Blotting-Kammer Trans-Blot SD	Biorad, München, D
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Elektrophoreseapparaturen für	
Agarosegele	Biorad, München, D
Polyacrylamidgele (130 x 80 x 1 mm)	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Polyacrylamidgele (245 x 180 x 1,5 mm)	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Elektroporator	Biorad, München, D
Elektroporationsküvetten	Molecular BioProducts, San Diego, USA
ELISA-Reader	Tecan, Crallsheim, D
Gefriertrockner ALPHA 1-2 LD	Christ, Osterode, D
Geldokumentationssytem	Intas, Göttingen, D
Geltrocknungsanlage	Biorad, München, D
Exposure Cassette	Biorad, München, D
Filtrierapparatur	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Photometer	
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen, D
ThermoSpectronic BioMate 3	Thermo Electron Corporation, Bremen, D
Kapillarelektrophorese 270 A	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D
PCR-Maschine	Eppendorf, Hamburg, D
Personal Molecular Imager	Biorad, München, D
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim, D
Reinstwasseranlage USF ELGA PureLab Plus	Elga Labwater, Celle, D
Schüttelinkubatoren	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Screen Eraser	Biorad, München, D
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, D
Stromversorgungsgerät Power Pac 1000	Biorad, München, D
Szintillationszähler Tri-Carb	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, D
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Ultraschallgerät Soniprep 150	Haake, Karlsruhe, D
Waagen	
Analysenwaage ABJ	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, D
Laborwaage BL 1500 S	Sartorius, Göttingen, D
Zentrifugen	
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman, München, D
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

2.2 Verbrauchsmaterial

DC-Alufolie Cellulose F	Merck, Darmstadt, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
ELISA-Platte	Greiner, Frickenhausen, D
Filterplatte	Millipore, Schwalbach, D
Kapillare, polyacrylamidbeschichtet	CS-Chromatographie Service, Langenwehe, D
Kulturschalen (60 x 15 mm)	Greiner, Frickenhausen, D
Micro Bio Spin Columns	Biorad, München, D
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden, D
Petrischalen (92 x 16 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (0,2 bis 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße für Szintillationszähler	Sarstedt, Nümbrecht, D
96well PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, D
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, München, D
Übernachtkulturröhrchen (13 ml Röhrchen mit Belüftungsstopfen)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	Renner, Darmstadt, D

2.3 Chemikalien

Agarose	Biozym, Oldendorf, D
Ammoniumperoxysulfat (APS)	Biorad, München, D
Ethidiumbromid	Fluka Chemika, Neu-Ulm, D
RNaseZap®	Ambion, Huntigdon, GB

Standardchemikalien, Salze u.ä. wurden im Allgemeinen von Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Spezielle Stoffe sind jeweils separat beschrieben.

2.4 Puffer und Medien

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden, wenn möglich, vor Gebrauch autoklaviert, bzw. mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) gegen RNasen behandelt und anschließend autoklaviert.

BCIP Stocklösung	0,5 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat in DMF
Blockierungslösung	10 % Magermilchpulver; 1x TBS
Coomassie-Entfärbelösung	45 % (v/v) Methanol; 45 % (v/v) Wasser; 10 % (v/v) Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R-250; 45 % (v/v) Methanol; 45 % (v/v) Wasser; 10 % (v/v) Eisessig
Detektionspuffer (für AP)	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M $MgCl_2$; 0,1 M NaCl; pH 9,5
DNA-Probenpuffer (6x)	10 mM Tris-HCl; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylen Cyanol FF; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA; pH 6,7
DNase-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl; 25 mM $MgCl_2$; pH 7,5
Elutionspuffer	3 M NaOAc; 0,1 % SDS; 0,001M EDTA; pH 5,2
LB-Medium	10 g NaCl/l; 5 g Hefe-Extrakt/l; 10 g Bacto-Trypton/l; pH 7,3
LB-Medium-Platten	1 l LB-Medium; 15 g Agarose
Ligase-Puffer (10x)	400 mM Tris-HCl; 100 mM $MgCl_2$; 100 mM DTT; 5 mM ATP; pH 7,8
PBS (10x)	1,38 M NaCl; 27 M KCl; 43 mM Na_2HPO_4; pH 7,3
PCR-Puffer (10x)	750 mM Tris-HCl; 200 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 % (w/v)Tween 20; pH 8,8
PNK-Puffer A (10x)	500 mM Tris-HCl; 100 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA; pH 7,6
Proteinprobenpuffer (5x)	0,225 M Tris-HCl; 50 % Glycerin; 5 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
RNA-Probenpuffer (2x)	95 % Formamid; 0,025 % SDS; 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylen Cyanol FF; 0,025 % Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA
RT-Puffer (5x)	250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; pH 8,3
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 6,8
SDS-Laufpuffer (5x)	124 mM Tris-HCl; 0,96 M Glycin; 0,5 % SDS; pH 8,3
Selektionspuffer A	5 mM NaCl; 4,3 mM K_2HPO_4; 1,4 mM NaH_2PO_4; 0,1 µM $CaCl_2$; pH 7,2
Selektionspuffer B	5 mM NaCl; 4,3 mM K_2HPO_4; 1,4 mM NaH_2PO_4; 0,1 µM $CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$; pH 7,2

SOC-Medium	20 g Trypton/l; 5 g Hefe-Extrakt/l; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; 20 mM Glucose
T7-Puffer (10x)	800 mM HEPES; 120 mM $MgCl_2$; 20 mM Spermidin; 50 mM DTT; pH 8,5
TAE-Puffer (50x)	40 mM Tris-HCl; 5 mM NaAc; 50 mM EDTA; pH 7,8
TBS (5x)	50 mM Tris-HCl; 750 mM NaCl; pH 7,5
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; pH 8,3
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 8,8
TSS-Lösung,	10 % PEG 8000; 5 % DMSO; 50 mM $MgCl_2$; 85 % LB-Medium; pH 6,5

2.5 Enzyme, Längenstandards und Kits

Calf Intestine Alkaline Photsphatase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
*Eco*RI	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Desoxyribonuclease I	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Lysozym	Merck, Darmstadt, D
Precision Plus Protein Dual Standard	Biorad, München, D
Precision Plus Protein Unstained Standard	Biorad, München, D
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot, D
pUC19/MspI	Fermentas, St. Leon-Rot, D
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, D
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden, D
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, D
Reverse Transcriptase (Thermoscript)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ribonuclease A	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RiboLock[TM] Ribonuclease Inhibitorr	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RNA Low Range Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T7-RNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
TempliPhi™ DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg, D
1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.6 Oligonucleotide, Nucleotide und Radiochemikalien

Pool SK	5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGAATTCAGAAGAATAGAATAG-(N40)- AGAGAGAGGGTGAAACTGCAGAGGCTG- 3'
Primer Pool Fw	5' –AGATTATGCTGAGTGATATCCCTTAAGTCTTCTTATCTTATC- 3'
Primer Pool Rev	5' –CAGCCTCTGCAGTTTCACCCTCTC- 3'
Primer VP2 *Eco*RI Fw	5' –GATCGAATTCTATGACAAACCTGCAAGATCA- 3'
Primer Tev *Hind*III Rev	5' – GATCAAGCTTGCCCTGAAAATATAAGTTTTCTGCTCCTGCAATCTTCAG- 3'
Primer *Hind*III Myc Rev	5'–GATCAAGCTTATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCCCTGAAAATATAAGTTTTCTG-3'

Alle aufgeführten Oligonucleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen, D) bezogen

dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
[γ-^{32}P]-ATP (Aktivität: 9,25 mBq)	Amersham Biosciences, Freiburg, D

2.7 Hühnereier, Vektoren, Bakterienstämme, und Antikörper

Befruchtete Hühnereier

Zur Herstellung von Kulturen aus HEF wurden befruchtete Hühnereier der Erzeuger- und Absatzgemeinschaft Borna e.G., Liebschützberg, D, bezogen und zehn Tage bei 38°C und 5 % CO_2 bebrütet.

pET-26b(+) (EMD Biosciences, Inc. San Diego, USA)

Der pET-26b(+) Vektor enthält eine N-terminale pelB Signalsequenz zur periplasmatischen Lokalisation des zu exprimierenden Proteins. Außerdem verfügt er an seinem C-Terminus über eine His-Tag®-Sequenz und einen T7-Promotor.

pGEM®-T Easy (Promega, Madison, USA)

Dieser Vektor ist ein Derivat des pGEM®-5Zf(+) Vektors (LIT), der mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV linearisiert wurde. An beiden 3´-Enden trägt dieser Vektor ein einzelnes T und wurde aufgrund dieser Eigenschaft in der vorliegenden Arbeit zur Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt.

DH5α, Top10
Hierbei handelt es sich um *E. coli* K12-Stämme, die für Klonierungen und molekularbiologische Standardanwendungen eingesetzt wurden.

BL21(DE3)pLysS
Für die Expression wurde dieser *E. coli* K12-Stamm verwendet, der unter anderem eine hoch effiziente Proteinexpression unter der Kontrolle eines T7 Promotors erlaubt.

Antikörper II/C3, monoklonal
Der monoklonale Antikörper II/C3 erkennt konformationsabhängige Epitope des Strukturproteins VP2 und stand im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig für Versuche bereit.

Antikörper B54, polyklonal
Bei diesem Antikörper handelt es sich um ein Kaninchenserum, das zwar gegen den Serotyp 2-Stamm 23/82 entwickelt wurde, aber mit gleicher Effizienz gegen den Serotyp 1-Stamm Cu-1 reagiert. B54 wurde ebenfalls vom Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig zur Verfügung gestellt.
Als kommerzielle primäre Antikörper, Direkt-Konjugate oder sekundäre Antikörper wurden verwendet:

Anti-His(C Term)Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe, D)
Anti-myc Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe, D)
Antikörper anti-mouse-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D)
Antikörper anti-rabbit-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D)

2.8 Virus

Der in den Versuchen verwendete Stamm Cu-1 ist eine in ihrer Virulenz abgeschwächte, zellkulturadaptierte Variante (Nick et al., 1976) des pathogenen Wildtyps Cu-1-wt, der 1975 bei einem Ausbruch der IBD in Deutschland isoliert wurde (Becht und Müller, 1991). Cu-1 führt in vier bis fünf Wochen alten SPF-Hühnern nicht zum Tod, verursacht jedoch eine hohe Morbidität mit vollständiger Zerstörung der BF (Lange et al., 1987).

2.9 Software

Gel-Pro	Intas, Göttingen, D
mfold 2.3	M. Zuker, Washington University School of Medicine, USA
MS Office 2000	Microsoft, Redmond, USA
Origin® 6.1	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Sci Ed Central	Scientific & Educational Software, Cary, USA

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in gentechnischen Laboren der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Die Arbeiten mit HEF und infektiösem Virus fanden in Laboratorien der Sicherheitsstufe S2 im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt. Für die Herstellung der verschiedene Pufferlösungen und Medien wurde Reinstwasser aus einer ELGA-Anlage genutzt, das für alle molekularbiologischen Arbeiten zudem durch Autoklavieren bei 1,4 bar Dampfdruck und 121 °C für 15 bis 20 min sterilisiert wurde. Ebenso autoklaviert wurden z. B. Medien und diverse Lösungen nach ihrer Herstellung. Puffer und Lösungen, die in Zusammenhang mit RNA verwendet werden sollten, wurden mit 0,1 % DEPC versetzt und nach Inkubation bei 37°C über Nacht autoklaviert. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und nach der Abkühlung der Lösungen auf unter 50 °C zugegeben. Alle molekularbiologischen Abfälle wurden vor ihrer endgültigen Entsorgung wie beschrieben autoklaviert.

3.2 Analytische Trennung und Reinigung von Nucleinsäuren

3.2.1 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Sowohl die analytische, als auch die präparative Trennung von DNA-Proben erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen mittels Agarosegelelektrophorese gemäß Sambrook (Sambrook et al., 1989). Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurden 0,8 – 2 % Gele (w/v) verwendet, die durch Aufkochen einer eingewogenen Menge Agarose in 1x TAE hergestellt wurden. Die erforderlichen Gele wurden in horizontale Gelkammern gegossen und analytische bzw. präparative Kämme eingesetzt. Nach der Verfestigung des Gels wurde die Laufkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Man versetzte die DNA-Proben mit $^1/_6$ Volumen Probenpuffer und pipettierte sie in die Probentaschen. Als Längenstandards wurden 500 ng pUC19/MspI oder 1 kb DNA Ladder verwendet. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte je nach Gelkonzentration bei 80 bis 110 V für 30 bis 90 min.

3.2.2 Nachweis von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid

Agarose- und Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe von Ethidiumbromid (4 µg Ethidiumbromid in 1 ml 1x TAE-Puffer) 5 bis 15 min gefärbt. Diese Färbung zählt zu den schnellsten und gebräuchlichsten Färbemethoden und ist besonders für den Nachweis von kleinen Mengen an Nucleinsäuren (ab 20 ng) geeignet (Sharp et al., 1973). Die

interkalierende Eigenschaft von Ethidiumbromid lässt den Nachweis von Nucleinsäuren als leuchtende Banden unter UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 312 nm zu, wobei das Tragen von Nitrilhandschuhen und einer UV-Schutzbrille unbedingt zu beachten sind.

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach ihrer Trennung mittels Gelelektrophorese aus den Agarosegelen zu isolieren, wurden die gewünschten Fragmente nach vorangegangener Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert und mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten. Danach erfolgte die Elution und Reinigung der DNA aus der Agarose unter Verwendung des QIAEX® II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, D). Auf diese Weise isolierte und gereinigte DNA stand den folgenden molekularbiologischen Methoden wie Ligation oder Analyse mittels Restriktionsenzymen zur Verfügung.

3.2.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse und Reinigung einzelner RNA-Fragmente oder des RNA-Pools wurden denaturierende Polyacrylamidgele inklusive 8 M Harnstoff benutzt. Bei der Präparation aller Gele, die Acrylamid enthielten, mussten aufgrund der Toxizität dieser Substanz Nitrilhandschuhe getragen werden.

8 % Gel:	TBE-Puffer (5x)	10 ml	**10 % Gel:**	TBE-Puffer (5x)	15 ml
	Acrylamid 40 %	10 ml		Acrylamid 40 %	10 ml
	Harnstoff	25,6 g		Harnstoff	25,6 g
	APS 10 %	300 µl		APS 10 %	300 µl
	TEMED	30 µl		TEMED	30 µl
	Aqua dest. ad	50 ml		*Aqua dest. ad*	50 ml

Der eingewogene Harnstoff wurde hierfür in den vorgesehenen Mengen TBE-Puffer (5x), Acrylamidlösung und *Aqua dest.* gelöst. Durch Zugabe von TEMED und APS wurde der Polymerisationsvorgang des Gels gestartet. Die fertige Lösung wurde in die vorher präparierte Gießkammer der Größe 130 x 80 x 1 mm (A) bzw. 245 x 180 x 1,5 mm (B) pipettiert, woraufhin der Probenkamm eingesetzt wurde. Nach vollständiger Polymerisation fand zunächst ein Vorlauf bei 12 W (A) bzw. 40 W (B) statt, wobei vor und nach dem Vorlauf alle Probentaschen sorgfältig mit 1x TBE-Puffer gespült wurden, um überschüssigen Harnstoff zu entfernen.
Die aufzutragenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 70 °C denaturiert und zügig auf das Gel aufgetragen. Anschließend fand die Gelelektrophorese bei 12 W (A) bzw. 40 W (B) in 1x TBE-Puffer für 15 min (A) bzw. 4 h (B) statt.

3.2.5 Nachweis von RNA in Gelen mit UV-Shadowing

Um RNA-Banden in präparativen Polyacrylamidgelen alternativ zur Ethidiumbromidfärbung zu detektieren, kann man die Eigenschaft der Nucleinsäuren, UV-Licht zu absorbieren, nutzen. Dafür wurde das Gel in Vernichtungsbeutel eingeschlagen und auf eine Kieselgelplatte mit Leuchtstoffzusatz gelegt. Bei einer Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm konnte somit die RNA als Schatten auf der Kieselgelplatte sichtbar gemacht und auf der Folie markiert werden. Die gekennzeichnete Bande wurde sofort mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um eine Kontamination der Probe durch ubiquitäre RNasen zu vermeiden, wurde das Skalpell vor Verwendung mit RNaseZap® behandelt.

3.2.6 Diffusionselution von RNA aus Polyacrylamidgelen

Die mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigte und mittels UV-Shadowing detektierte RNA wurde durch Diffusionselution aus den ausgeschnittenen Gelstücken isoliert. Hierfür wurden die Gelstücke weiter zerkleinert, einmal für 2 h bei 65 °C und einmal für 12 h bei 21°C in Elutionspuffer inkubiert. Die erhaltenen Elutionslösungen wurden vereinigt und beinhalteten die gewünschte RNA.

3.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Eine Abtrennung von Proteinen aus Nucleinsäurelösungen wurde durch Extraktion mit Phenol durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol (natriumacetatgesättigt, pH 5,5) kräftig gemischt und anschließend für 3 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die hierbei entstandene, obere wässrige Phase enthielt nun die RNA-Probe und wurde durch analoge Behandlung mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) von etwaigen Phenolrückständen befreit.

3.2.8 Ethanolfällung

Um unerwünschte Komponenten der Nucleinsäurelösungen zu entfernen und die Lösung selbst zu konzentrieren, wurde eine so genannte Ethanolfällung angewandt. Hierbei nützt man die Tatsache, dass sich in Gegenwart von monovalenten Kationen ein unlöslicher Niederschlag aus Nucleinsäuren in Lösungen bildet, der durch einen einfachen Zentrifugationsschritt
isoliert werden kann (Jurk, 1998). Die eigentliche Präzipitation erfolgte in diesem Fall durch Zugabe von $^1/_{10}$ Volumen 3 M NaOAc-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (abs.), wobei die Probe gut durchmischt und für etwa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach einer darauf folgenden Zentrifugation für 15 min und 15.000 g bei 4 °C wurde der Überstand dekantiert und das gewonnene Pellet mit 50 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Durch einen identischen Zentrifugationsschritt konnte das Pellet wiederum isoliert und danach

luftgetrocknet werden. Das Pellet beinhaltete nun die gereinigte und konzentrierte RNA, die in DEPC-behandeltes Wasser oder den gewünschten Puffer aufgenommen werden konnte.
Ein analoger Präzipitationsvorgang wurde nach der beschriebenen Diffusionselution durchgeführt, wobei allerdings keine NaOAc-Lösung mehr zugesetzt werden musste, da diese bereits im zuvor benutzten Elutionspuffer (vgl. 2.4) enthalten war.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in je 2 µl Volumina im NanoDrop ND-1000 bestimmt. Ausschlaggebend für diese Bestimmung sind die Heterozyklen der Basen, wobei folgende Zusammenhänge für die Umrechnung gelten (Jurk, 1998):

1 OD_{260}	≈	50 µg/ml dsDNA
1 OD_{260}	≈	33 µg/ml RNA
x pmol	≈	(x µg x 10^6) / (325 x Anzahl der Basen)

3.3 Präparation von Nucleinsäuren

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung (bis Faktor 10^8) von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1986), wobei neben der DNA-Matrize (Templat) zwei flankierende Oligonucleotide (Primer) benötigt werden. Diese Primer sind dem jeweiligen 3'-Ende des Templates komplementär. Durch wiederholte cyclische Ausführung von Denaturierung, Primeranlagerung (Hybridisierung) und DNA-Synthese (Extension) mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase kann eine exponentielle Amplifikation der Ausgangs-DNA erreicht werden.
In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR im herkömmlichen Sinn zur Herstellung des für die Klonierung des VP2-Gens notwendigen Inserts, zur Vervielfältigung der selektierten transcribierten DNA-Sequenzen und für die Einführung eines für die *in vitro*-Transcription essentiellen T7-Promotors angewendet.

Fill-in-Reaktion
Um genügend Ausgangsmaterial für mehrere SELEX-Experimente zu erhalten, wurde mit dem DNA-Template Pool SK eine Fill-in-Reaktion durchgeführt. Im Unterschied zu einer herkömmlichen PCR ist diese Reaktion durch einen einzigen Ablauf von Denaturierung, Hybridisierung und Extension, sowie durch die Verwendung eines Primers gekennzeichnet. Als Resultat erhält man doppelsträngige DNA, die in diesem Fall einen vollständigen T7-Promotor beinhaltet.

Fill-in-Reaktion:	ssDNA [100 µM]	50 µl
	10x PCR-Puffer	500 µl
	Primer Pool Rev [100 µM]	100 µl
	$MgCl_2$ [12 mM]	1600 µl
	dNTPs [25 mM]	80 µl
	Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	25 µl
	Aqua dest. ad	5000 µl

Temperatur-profil:	94 °C / 2 min	Denaturierung
	69,6 °C /5 min	Hybridisierung
	72 °C / 5 min	Extension

RT-PCR (PCR nach reverser Transcription)

Die RT-PCR wurde im Anschluss an eine reverse Transcription (RT) durchgeführt. Als Template diente die in der RT synthetisierte cDNA.

RT-PCR:	RT-Ansatz	10 µl
	10x PCR-Puffer	10 µl
	Primer Pool Fw [100 µM]	2 µl
	Primer Pool Rev [100 µM]	2 µl
	$MgCl_2$ [12 mM]	32 µl
	dNTPs [4mM]	5 µl
	Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
	Aqua dest. ad	100 µl

Temperatur-profil:	94 °C / 30 s	Denaturierung
	69,6 °C /30s	Hybridisierung
	72 °C / 30 s	Extension

Zur Erhöhung der Ausbeute an dsDNA wurden insgesamt fünf PCR-Aliquots mit je $^1/_5$ des RT-Ansatzes durchgeführt. Dabei diente ein Ansatz ohne DNA-Template als Kontrolle auf Kontamination mit Fremd-DNA. Die Zyklenanzahl orientierte sich an der Menge der einzusetzenden RNA. Um die Effizienz der Amplifikation zu überprüfen, erfolgte nach je fünf Zyklen eine Entnahme von jeweils 10 µl RT-PCR-Probe. Diese Aliquots wurden auf einem 2 % Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung (siehe 3.2.2) analysiert. Nach ausreichender Amplifikation wurde die erhaltene dsDNA einer Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 3.2.7) mit anschließender Ethanolfällung (siehe 3.2.8) unterzogen und stand danach gereinigt und konzentriert einer *in vitro*-Transcription zur Verfügung.

PCR zur Vervielfältigung selektierter Sequenzen

Die DNA von ausgewählten und sequenzierten Klonen wurde in Übernachtkulturen angereichert und mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, D) isoliert und gereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Sequenzen wurde jede Probe durch PCR vervielfältigt, um im Anschluss für eine T7-Transcription und Bindungsstudien zur Verfügung zu stehen. Jede Probe wurde in vier 100 µl Ansätzen amplifiziert, wobei das beschriebene Temperaturprofil 25 mal durchlaufen wurde.

PCR:	DNA	50 ng
	PCR-Puffer (10x)	10 µl
	Primer Pool Fw [100 µM]	2 µl
	Primer Pool Rev [100 µM]	2 µl
	$MgCl_2$ [12 mM]	32 µl
	dNTPs [4mM]	5 µl
	Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
	Aqua dest. ad	100 µl

Temperatur-profil:	94 °C / 30 s	Denaturierung
	69,6 °C /30s	Hybridisierung
	72 °C / 30 s	Extension

3.3.2 *In vitro*-Transcription

Im Rahmen einer in vitro-Transcription werden mit Hilfe der aus dem Bakteriophagen T7 isolierten DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase DNA-Sequenzen in RNA-Sequenzen überführt. Der hierfür notwendige T7-Promotor war innerhalb der umzuschreibenden Sequenzen vorhanden, weshalb die isolierte und gereinigte DNA sofort in einer *in vitro*-Transcription eingesetzt werden konnte.

***in vitro*-Transcription:**	DNA-Template	15 µl
	T7-Transcriptions-Puffer (5x)	20 µl
	NTPs [10 mM]	20 µl
	RNase-Inhibitor [40 U/µl]	2 µl
	T7- Polymerase[20 U/µl]	3 µl
	Aqua dest. ad (DEPC-behandelt)	40 µl

Bei vorangegangener PCR standen für jede Sequenz 400 µl PCR-Ansatz zur Verfügung, die zu je 15 µl in der T7-Transcription eingesetzt wurden. Somit belief sich das Gesamtvolumen der *in vitro*-Transcription einer Sequenz auf knapp 26 Ansätze. Die Durchführung dieser Reaktion in größeren Volumina wurde vermieden, um eine optimale Durchmischung der

einzelnen Bestandteile zu gewährleisten. Die Transcriptionsreaktion erfolgte wahlweise für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur.
Nach erfolgter *in vitro*-Transcription wurde eine DNase-Verdauung der einzelnen Ansätze mit je 1 µl DNaseI [10 U/µl] für 30 min bei 37 °C und eine Ethanolpräzipitation (vgl. 3.2.8) angeschlossen, bei der die Aliquots der einzelnen Sequenzen wieder vereinigt werden konnten. Nach Präzipitaion mit Ammoniumacetat wurde eine Reinigung des Ansatzes über eine 10 % denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese über etwa sechs Stunden angeschlossen (vgl. 3.2.4). Die aufgetrennte RNA wurde mittels UV-Shadowing sichtbar gemacht (vgl. 3.2.5), aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Diffusionselution isoliert (vgl. 3.2.6). Nach einer darauf folgenden Ethanolpräzipitation stand die gereinigte und konzentrierte RNA für weitere Experimente zur Verfügung.

3.3.3 Reverse Transcription (RT)

Die umzuschreibende RNA wurde für 1 min auf 95 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt, um eine Anlagerung des 3' Primers an die RNA zu ermöglichen.

Hybridisierungsansatz:	selektierte RNA	~ 0,5 µl
	Primer Pool Rev [100 µM]	1 µl
	Aqua dest. ad	32 µl

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die RNA-Probe mittels reverser Transcriptase (ThermoScript®) für 1h bei 42 °C in cDNA umgeschrieben.

Reverse Transcription:	Hybridisierungsansatz	30 µl
	RT-Puffer (5x)	10 µl
	dNTPs [4 mM]	4 µl
	DTT [100 mM]	2 µl
	ThermoScript® [15 U/µl]	2 µl
	Aqua dest. ad	50 µl

3.3.4 Ligation

Ein Aliquot der selektierten RNA, umgeschrieben in cDNA, wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) gereinigt und mit dem linearisierten Plasmid mit 3' - Überhängen an Thymidin (pGEM®-T Easy) ligiert, wobei der Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wurde.

Ligationsansatz:	Ligase-Puffer (10x)	1 µl
	PCR-Produkt	5 µl
	pGEM®-T Easy Vektor	50 ng
	T4-DNA-Ligase [5U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad	10 µl

3.3.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen für die Elektroporation

Fünf Einzelkolonien des *E. coli*-Stammes Top10 wurden gepickt und zur Animpfung von 200 ml SOC-Medium verwendet. Der Zweiliterkulturkolben wurde bei 220 rpm und 37 °C inkubiert, bis die Zellen die mittlere Wachstumsphase -nachweisbar durch eine OD_{600nm} von 0,4- erreichten. Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mittels Zentrifugation für 10 min bei 4.000 g und 4 °C pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment mit 50 ml eiskaltem *Aqua dest.* gewaschen und erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Waschschritt mit *Aqua dest.* wurde noch zweifach wiederholt. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

Kompetente Zellen mittels $CaCl_2$-Behandlung

Um chemisch kompetente Zellen herzustellen, wurden zunächst 50 ml LB-Medium in einem Halbliterkulturkolben mit einer Einzelkolonie *E. coli* Top10 angeimpft. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 220 rpm und 37 °C, bis die Zellen eine OD_{600nm} von 0,4 erreicht hatten. Nach einem Abkühlungsschritt der Zellsuspension auf Eis für etwa 20 min erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 g und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das verbleibende Pellet in 2 ml TSS-Lösung resuspendiert werden. Diese Suspension wurde ebenfalls in 200 µl-Proben aufgeteilt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.6 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Transformation von kompetenten E. coli-Zellen mittels Elektroporation

Die Elektrotransformation erfolgte mit elektrokompetenten *E. coli*-Zellen (vgl. 3.3.5), die bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut wurden. 5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes wurden zu 200 µl Zellen pipettiert. Diese Lösung wurde nun in eine Elektroporationsküvette transferiert und bei 1,8 kV in einem Elektroporator der Firma Biorad (München, D) maximal 1 s transformiert. Sofort nach der eigentlichen Transformation wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium aus der Küvette gespült und in ein 1,5 ml Gefäß transferiert, in dem sie 45 min bei 500 rpm und 37 °C im Thermomixer geschüttelt wurden, um die auf dem Vektorplasmid vorhandene Antibiotika-Resistenz zu entwickeln. Verschiedene Volumina von 20 µl bis 150 µl konnten, der Resistenz des Vektors entsprechend, auf LB^{Kan}- bzw. LB^{AMP}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden.
Um eine korrekte Durchführung der Transformation zu gewährleisten, wurde sowohl eine Blindprobe ohne DNA (Negativkontrolle), als auch eine Probe mit Vektor-DNA (Positivkontrolle) transformiert.

Transformation von kompetenten E. coli-Zellen durch Hitzeschock-Behandlung

Zur Transformation von durch $CsCl_2$-Behandlung kompetent gemachten *E. coli*-Zellen (vgl. 3.3.5) mittels der Ligationsprodukte wurden 200 µl der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl DNA behutsam gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis fand eine Hitzeschockreaktion für 90 s bei 41 °C statt, während der es zur Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen kam. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde wiederum eine Abkühlung des Ansatzes für 2 min auf Eis durchgeführt, gefolgt von der Zugabe von 800 µl SOC-Medium. Für die Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz wurde die Zellsuspension für 45 min bei 500 rpm und 37 °C im Thermomixer inkubiert. Der ausgebildeten Resistenz entsprechend wurden verschiedene Volumina von 20 µl bis 150 µl auf LB^{Kan}- bzw. LB^{AMP}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
Bei dieser Art der Transformation wurden ebenfalls Negativ- und Positivkontrollen transformiert und ausgestrichen.

3.3.7 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden erfolgte immer mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) nach Vorschrift des Herstellers, wobei die Elutionsfraktion in 30 µl Aqua dest. aufgefangen wurde.

3.3.8 DNA-Sequenzierung

Alle anfallenden Sequenzierungen wurden von Frau Elena Hensel unter Verwendung des TempliPhi™ Kits vorbereitet. Die Sequenzierungsansätze wurden am Institut für Pathologie

des Universitätsklinikums Eppendorf von Frau Agata Blaszczyk-Wewer bearbeitet und an dem Gerät 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der gerätespezifischen Software.

3.4 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung und Reinigung von rekombinantem viralen Protein

Für die rekombinante Produktion des viralen Hüllproteins VP2 waren verschiedene Schritte notwendig. Das Endkonstrukt bestand aus der das VP2 codierenden DNA, fusioniert mit einem Myc-Tag und einer Erkennungssequenz für die AcTEV™ Protease. Es war zudem in den Expressionsvektor pET-26b(+) inklusive His-Tag ligiert. Seine Herstellung erforderte zwei aufeinander aufbauende PCR-Reaktionen. Das Amplifikat der ersten PCR, ligiert in den genannten Vektor, diente als Templat für die zweite PCR. Das dort hergestellte Fragment erhielt nun das Myc-Tag und wurde mit dem Expressionsvektor pET-26b(+)ligiert.

3.4.1 Herstellung von VP2, Teil I

Herstellung von Insert-DNA mittels PCR I

Zur Amplifikation der das VP2 codierenden Region wurde eine Standard-PCR eingesetzt, wobei ein pUC18-Plasmid mit dem kompletten Segment A des deutschen IBDV-Stammes Cu-1 als Template zur Verfügung stand. Üblicherweise wurden vier 50 µl pro PCR-Ansatz verwendet, um genügend DNA für weitere Behandlungen zur Verfügung zu haben. Insgesamt waren 25 PCR-Zyklen ausreichend, um eine effiziente Amplifikation des erwünschten DNA-Fragments zu erzielen.

PCR I:	DNA [100-200 pmol]	5 µl
	PCR-Puffer (10x)	5 µl
	Primer VP2 *Eco*RI Fw [10 µM]	5 µl
	Primer Tev *Hind*III Rev [10 µM]	5 µl
	dNTPs [25 mM]	5 µl
	Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad	50 µl

Temperatur-profil:	94 °C / 30 s	Denaturierung
	59 °C /90 s	Hybridisierung
	72 °C / 2 min	Extension

Spaltung der amplifizierten dsDNA mit Restriktionsendonucleasen

Um eine Ligation des hergestellten DNA-Fragments in den Expressionsvektor pET-26b(+) zu ermöglichen, musste das PCR-Produkt zunächst mit den dafür vorgesehenen Enzymen geschnitten werden. Für die Verdauung wurde das gereinigte Amplifikat dem beschriebenen Ansatz entsprechend behandelt.

Verdauungsansatz Insert- / Vektor-DNA:	DNA (100-200 pmol)	20 µl
	Restriktionspuffer (10x)	10 µl
	*Eco*RI bzw. *Hind*III	2 µl
	Aqua dest. ad	100 µl

Da mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen geschnitten werden sollte, mussten zwei separate Verdauungsansätze für jedes Enzym in unterschiedlichen Puffern erfolgen. Zwischen diesen beiden Verdauungen war eine Reinigung der geschnittenen DNA mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) notwendig, um die jeweils optimalen Bedingungen für die beiden Enzyme zu schaffen. Analog zur Verdauung der Insert-DNA wurde auch der Vektor pET-26b(+) verdaut, um ihn für die Ligation mit dem Insert vorzubereiten.

Ligation von geschnittener Insert-DNA nach PCR I und geschnittener Vektor-DNA

Für den Ligationsansatz wurde ausschließlich DNA verwendet, die mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) gereinigt wurde. Die Ligation von Insert und Vektor pET-26b(+) erfolgte für 2 h bei 37 °C im Thermomixer, bzw. über Nacht bei Raumtemperatur. Vom gesamten Ligationsansatz wurden etwa 2 µl direkt für eine Transformation verwendet.

Ligationsansatz:	Ligase-Puffer (10x)	1 µl
	Insert-DNA	ca. 100 pmol
	Vektor-DNA	ca. 1 µg
	T4-DNA-Ligase [5U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad	20 µl

3.4.2 Herstellung von VP2, Teil II

Herstellung von Template-DNA mittels PCR II

Nach erfolgreicher Darstellung der das VP2 kodierenden Sequenz im Expressionsvektor pET26 b(+) diente dieses Konstrukt (VP2 in pET26) in gereinigter Form als Templat für eine weitere PCR (PCR II). In diesem Schritt sollte das rekombinante Protein mit einem Myc-Tag fusioniert werden.

PCR II:	Template VP2 in pET26	2,5 µl
	PCR-Puffer (10x)	5 µl
	Primer VP2 *Eco*RI Fw [10 µM]	2,5 µl
	Primer *Hind*III Myc R [10 µM]	2,5 µl
	dNTPs [25 mM]	5 µl
	Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad	50 µl

Temperatur-profil:	95 °C / 30 s	Denaturierung
	50 °C / 1 min	Hybridisierung
	72 °C / 3 min	Extension

Bereits ein 50 µl Ansatz war ausreichend, um als Template für den letzten Schritt dieses Klonierungsschrittes zu dienen und wurde sofort nach der PCR II gereinigt.

Spaltung der amplifizierten dsDNA mit Restriktionsendonucleasen

Um eine Ligation des finalen DNA-Fragments in das dafür vorgesehene Konstrukt VP2 in pET26 zu ermöglichen, mussten beide Moleküle zunächst mit den dafür vorgesehenen Enzymen verdaut werden. Für die Verdauung wurden das gereinigte Amplifikat der PCR III und VP2 in pET26 dem beschriebenen Ansatz entsprechend verdaut.

Verdauungsansatz	**Amplifikat nach PCR II bzw. VP2 in pET26:**	DNA	30 µl
		Restriktionspuffer (10x)	10 µl
		*Sac*I bzw. *Hind*III	2 µl
		Aqua dest. ad	100 µl

Für jedes Enzym musste ein separater Verdauungsansatz durchgeführt werden, um ein effizientes Schneiden der Restriktionsendonucleasen zu ermöglichen. Zwischen zwei Verdauungen wurde die geschnittene DNA mit dem QIAquick® PCR Purification Kit

(Qiagen, Hilden, D) gereinigt. Nach der Verdauung waren je Ausgangs-DNA zwei verschiedene Fragmente vorhanden, von denen jeweils eines um ein Vielfaches größer als das andere und somit sehr gut von diesem zu unterscheiden war.

Ligation der geschnittenen Insert-DNA nach PCR II und des geschnittenen Konstruktes VP2 in pET26

Zwei der beschriebenen verdauten DNA-Fragmente wurden nach ihrer Reinigung und einer analytischen Gelelektrophorese (vgl. 3.2.1) über die Schnittstellen *Sac*I und *Hind*III miteinander ligiert. Diese Reaktion fand über Nacht bei 16 °C im Thermomixer statt.

Ligationsansatz:	Insert-DNA (verdautes Amplifikat nach PCR II)	2 µl
	Vektor-DNA (verkürztes Konstrukt VP2 in pET26)	2 µl
	Ligase-Puffer (10x)	1 µl
	T4-DNA-Ligase [5U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad	10 µl

Direkt im Anschluss an die Ligation konnten 3 µl des Ansatzes in einer Elektroporation (vgl. 3.3.6) eingesetzt werden. Nach Inkubation der ausgestrichenen Kolonien bei 37 °C über Nacht konnte eine Einzelkolonie von der Platte gepickt und wiederum bei 37 °C , 220 rpm und über Nacht in 3 ml LB-Medium inklusive Kanamycin [50 µM] im Inkubationsschüttler inkubiert und am nächsten Morgen für eine Proteinproduktion verwendet werden.

3.4.3 Produktion und Reinigung von VP2 in *E.coli*-Zellen

Rekombinante Produktion von VP2 in E.coli

Die Produktion von rekombinantem VP2 erfolgte in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3)pLysS in einem Ansatz von 200 ml. Dieses Volumen LB-Medium inklusive 50 µM Kanamycin wurde in einen Zweiliterkulturkolben überführt und mit 2 ml der am Tag zuvor zubereiteten Übernachtkultur angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von etwa 4 h hatten die Zellen eine optische Dichte von 0,6 erreicht, die im Photometer bei 600 nm verfolgt werden konnte. Durch die Zugabe von IPTG [1mM] konnte die Produktion von VP2 induziert werden. Nach einer Wachstumsphase von 3 h bei 24 °C wurde die Zellsuspension für 15 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml 1x PBS resuspendiert. Eine anschließende Behandlung mit Ultraschall für fünfmal 30 s, alternierend mit je 30 s Pause ging einem erneuten Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4.000 g und 4 °C voraus. Das resultierende Pellet wurde in 20 ml 8 M Harnstoff in 1x PBS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Reinigung des Produktionsansatzes mittels Affinitätschromatographie

Die denaturierend behandelte Probe konnte am nächsten Tag für 5 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert werden. Der Überstand wurde im Anschluss mit 2 ml Ni-NTA-Superflow Matrix der Firma Qiagen (Hilden, D) und 20 mM Imidazol über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert, um eine Bindung der mit einem His-Tag versehenen Proteine an die Nickel-Matrix zu ermöglichen. Nach wiederholter Zentrifugation für 5 min bei 4.000 g und 4 °C und zweimaligem Waschen mit 8 M Harnstoff in 1x PBS wurde das Pellet, bestehend aus denaturierter Proteinprobe gebunden an Nickel-Matrix, in 2 ml 8 M Harnstoff in 1x PBS aufgenommen und eine kleine Chromatographiesäule der Firma Biorad (München, D) damit befüllt. Um eine homogene Verteilung des Säulenmaterials zu erhalten und ungebundene Bestandteile zu entfernen, wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina Waschpuffer (vgl. 2.4) ohne Imidazol gewaschen. Danach fand die Elution fünf Säulenvolumina durch Elutionspuffer (vgl. 2.4) inklusive 300 mM Imidazol statt, wobei sämtliche Wasch- und Elutionsfraktionen manuell in 500 µl-Aliquots aufgefangen wurden.

3.5 Analyse von rekombinantem, gereinigten VP2

3.5.1 Photometrische Analyse der gereinigten Fraktionen

Um einen ersten Überblick über den Reinigungserfolg durch die angewandte Affinitätschromatographie zu erhalten, wurden alle gesammelten Fraktionen im Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm auf ihre Absorption hin überprüft. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen in einer UV-Küvette gegen den Elutionspuffer als Leerwert vermessen. Fraktionen, die eine Absorption von 0,1 und höher aufwiesen, wurden im Anschluss durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert.

3.5.2 Analyse der gereinigten Fraktionen mittels SDS-PAGE

Die durch die Expression und Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen konnten durch die Bestimmung ihrer Absorption bereits weiter charakterisiert werden. Da durch die Absorption jedoch keine Aussage über die Reinheit der vorhandenen Proben getroffen werden konnte, wurden sie mit Hilfe einer SDS-PAGE getrennt. Hierfür wurden Gele mit einem Anteil von 12 % Acrylamid/Bisacrylamid verwendet (Sambrook et al., 1989).

12 % Trenngel:	Trenngelpuffer (4x)	2,5 ml	**4 % Sammelgel:**	Sammelgelpuffer (4x)	1,26ml
	Acrylamid 40 %	4 ml		Acrylamid 40 %	830 µl
	APS 10 %	100 µl		APS 10 %	50 µl
	TEMED	4 µl		TEMED	5 µl
	Aqua dest. ad	10 ml		*Aqua dest. ad*	5 ml

Die zu untersuchenden Proben wurden mit $^1/_5$ Volumen Probenpuffer versetzt, dem zur Reduktion von intra- und intermolekularen Disulfidbrückenbindungen 0,1 M DTT zugesetzt war. Eine vollständige Denaturierung der Fraktionen wurde durch Erhitzen für 5 min bei 65 °C im Thermocycler erreicht. Danach konnte das zuvor gegossene und auspolymerisierte Gel mit den einzelnen Proben und dem Protein-Standard beladen werden. Die eigentliche gelelektrophoretische Trennung der Proteinlösungen fand in 1x SDS-Laufpuffer für etwa 1,5 h bei 150 V statt. Nachdem die Lauffront das Gel verlassen hatte, wurde eine Färbung mit Coomassie-Farbstoff, bzw. ein Western Blot angeschlossen.

Färbung eines SDS-Gels mit Coomassie-Blau

Für diese Färbemethode wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen, während das Trenngel über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken, von der Färbelösung reichlich bedeckt, inkubiert wurde. Nach Dekantieren des Farbreagenz wurde das Gel in drei identischen Schritten für je 15 min mit Entfärbelösung bedeckt und ebenfalls bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Eine Reduktion des leicht bläulichen Hintergrundes konnte durch Aufbewahren des Gels in *Aqua dest.* erzielt werden. In diesem Zustand konnten alle Trenngele bis zu ihrer endgültigen Auswertung aufbewahrt werden.

Identifizierung von rekombinantem VP2 mittels Western Blot

Um eine zweifellose Identifizierung des exprimierten VP2 zu ermöglichen, wurden mit Hilfe der vorher durch SDS-PAGE getrennten Proteine mehrere Immunoprints durchgeführt. Dafür wurde das Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, die innerhalb eines Stapels von Filterpapier auf der Apparatur justiert war. Filterpapier und Membran waren zuvor für 5 min in Transferpuffer getränkt worden. Mit dem Semidry-Verfahren wurden die im Gel getrennten Proteine für 1,5 h bei 100 mA auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Nach Beendigung des Blotting-Verfahrens wurden Gel und Filterpapiere verworfen, während die Membran bedeckt von 10 % Milchpulver 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler zur Blockierung der nicht von Protein bedeckten Bindungsstellen inkubiert wurde. Ein dreimaliger Waschschritt mit je 10 ml 1x TBS führte zu Entfernung von überschüssigem Milchpulver. Im Anschluss wurde die Membran mit 5 % Milchpulver in 1x TBS für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit einem monoklonalen Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 behandelt. Als monoklonale Antikörper wurden der VP2

spezifische II/C3, der vom Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig zu Verfügung gestellt wurde, und die beiden kommerziell erhältlichen Antikörper Anti-His(C Term) und Anti-myc (beide Invitrogen, Karlsruhe, D) je nach erwünschtem Detektionsresultat verwendet. Auch hier folgte ein dreifacher Waschschritt mit reichlich 1x TBS. Für die Detektion der gebundenen mAk wurde anti-mouse-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D) in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5 % Milchpulver in 1x TBS verwendet. Diese Inkubation erfolgte unter identischen Bedingungen wie die vorangegangenen Behandlungen der Membran. Sowohl mAk, als auch das IgG-AP-Konjugat konnten wahlweise auch über Nacht bei 4°C auf der Membran belassen werden. Danach wurde der Blot wiederum intensiv (drei- bis fünfmal) mit 1x TBS von überschüssigem Antikörper befreit und stand für die Entwicklungsreaktion bereit. Für diesen Teil wurde die Nitrozellulosemembran von Detektionspuffer vollkommen bedeckt und bis zur Visualisierung von dunkel gefärbten Banden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss aufbewahrt. Nach erfolgreicher Umsetzung des im Detektionspuffer vorhandenen Substrates durch die Alkalische Phosphatase wurde die Entwicklerlösung entsorgt und die Membran luftgetrocknet und stand einer Auswertung zur Verfügung.
Immunoprints wurden prinzipiell identisch durchgeführt, wobei statt des mAk ein polyklonales Serum (B54) eingesetzt wurde, welches ebenfalls im Institut für Virologie der Veterinärmedizinschen Fakultät Leipzig vorrätig war und in der vorliegenden Arbeit benutzt werden konnte. Als zweiter Antikörper diente in diesen Fällen das anti-rabbit-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D), alle anderen Reagenzien und Schritte waren identisch.

3.6 Methoden zur Herstellung und Reinigung von Virus

Der deutsche IBDV-Stamm Cu-1 war im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig vorrätig und konnte in den dort ansässigen gentechnischen Laboratorien der Sicherheitsstufe 2 angezüchtet und gereinigt werden.

3.6.1 Herstellung von Saatvirus

Die Anzüchtung von so genanntem Saatvirus erfolgte in primären HEF-Kulturen (Cursiefen et al., 1979). Dabei wurden die in 16 cm-Petrischalen einschichtig gewachsenen Zellen einmalig mit 1x PBS gewaschen und mit 5 ml einer bereits vorhandenen Virussuspension (MOI = 0,5; in Kulturmedium ohne FKS verdünnt vorliegend) infiziert. Nach einer Adsorptionsphase von etwa 1 h bei 38 °C im Brutschrank wurde der Überstand entfernt und durch 25 ml Kulturmedium ersetzt. Nach etwa 36 h Inkubationsdauer ebenfalls bei 38 °C im Brutschrank wurden die vorhandenen Platten einem dreimaligen Frier-Tau-Prozess unterzogen. Hierbei wurden die Platten bei -20 °C eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut, was zu einer Freisetzung des Virus aus den Zellen führte. Die entstandenen Zelltrümmer

konnten mit Zellschabern von den Platten entfernt und in Zentrifugationsröhrchen überführt werden. Bei einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 3.345 g wurde der Überstand gewonnen, aliquotiert und vorerst bei -80 °C aufbewahrt. Die Infektiösität des im Überstand vorhandenen Saatvirus wurde im Plaquereduktionstest ermittelt.

3.6.2 Reinigung des Saatvirus mittels CsCl-Gradienten

Um reines Virus herzustellen, wurde zunächst wie bei der Herstellung von Saatvirus vorgegangen (vgl. 3.6.1). Der aufgetaute Überstand wurde anschließend für 4 h bei 53.900 g zentrifugiert, wodurch sich eine Pellet bildete, in dem das Virus lokalisiert war. Dieses Zellpellet konnte nun in 1x PBS resuspendiert und weiter verarbeitet werden.
Die Reinigung und Konzentrierung des Virus erfolgte nach der Methode von Lange (Lange, 1985). Hierbei wurden die resuspendierten Zellen auf Zentrifugationsgefäße verteilt, mit 1,1,2- Trichlorotrifluorethan (Frigen) versetzt (1 Volumen Frigen auf 2 Volumina Zellsuspension) und durch Ultraschallbehandlung für 5 x 10 s aufgebrochen. Danach erfolgte eine Präzipitation der Zelltrümmer mittels Zentrifugation für 10 min bei 3.345 g und 4 °C. Der gewonnene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet nach Zugabe von 10 ml 1x PBS erneut beschallt und zentrifugiert. Die Überstände der ersten und zweiten Zentrifugationsschritte wurden vereinigt und nach Zugabe von Frigen ein weiteres Mal beschallt und zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden wiederum mit 1x PBS bis auf ein Volumen von je 28 ml aufgefüllt und mit 5 ml CsCl der Dichte 1,3 $^{g}/_{ml}$ sowie 5 ml CsCl der Dichte 1,4 $^{g}/_{ml}$ sorgsam unterschichtet. Danach wurden die Proben für 2,5 h bei 72.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation wurden die einzelnen Virusbanden in den Proben unter Zuhilfenahme einer Kaltlichtquelle visualisiert, mit einer Spritze abgezogen und mit 1x PBS auf ein Volumen von 7 ml eingestellt. Für eine wiederholte Gradientenzentrifugation wurden die Überstände mit 2 ml CsCl der Dichte 1,3 $^{g}/_{ml}$ sowie 2 ml CsCl der Dichte 1,4 $^{g}/_{ml}$ erneut unterschichtet und abermals 2,5 h bei 155.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und die Virusbanden analog zum ersten Gradienten gewonnen. Die abgezogenen Banden wurden abschließend durch Zentrifugation für 3 h bei 275.000 g pelletiert. Das nach Dekantieren des Überstandes gewonnene Pellet wurde in 100 µl 1x PBS resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.6.3 Plaquereduktionstest

Zur Bestimmung der Infektiösität des hergestellten und gereinigten Virus-Stammes Cu-1 wurden Plaquereduktionstests durchgeführt, sodass der Titer des Virus für weitere Versuche eindeutig verifiziert werden konnte.
Mit der zu titrierenden Probe wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) der Virussuspension in Kulturmedium hergestellt. Je zwei 6 cm-Kulturschalen mit HEF wurden nach einmaligem Waschen mit 1x PBS mit 0,2 ml Virussuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe beimpft

und für 1 h bei 38 °C unter intermittierendem Schwenken im Brutschrank inkubiert. Nach dem sorgfältigen Entfernen des Inokulums wurden die infizierten Zellen mit 4 ml halbfestem Medium (Overlay I) überschichtet und für 3 Tage bei 38 °C inkubiert.

Overlay I pro Platte (6 cm):	DMEM (2x)	2 ml
	Agar 1,4 % Difco Laboratories, Detroit, USA	2 ml
	Antibiotika (Pen/Strep)	4 µl
Overlay II pro Platte (6 cm) zusätzlich mit:	Neutralrot	3 %

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jede Platte erneut mit halbfestem Medium überzogen, wobei dem Medium 3 % Neutralrot zugesetzt waren. Vorhandene Plaques konnten nach Färbung der lebenden und somit nicht von Virus infizierten Zellen sichtbar gemacht und ausgezählt werden. Dabei wurde der Virustiter in plaquebildenden Einheiten (PBE) pro ml unverdünnter Virussuspension angegeben.

3.6.4 Inaktivierung gereinigter Viruspartikel durch UV-Licht

Zur Inaktivierung ihrer Infektiösität wurden CsCl-gereinigte Viruspartikel von IBDV in Kulturmedium verdünnt und in 6 cm-Kulturschalen bei abgenommenem Deckel für 30 min bei Raumtemperatur mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm in einem Abstand von 4 cm behandelt. Die Inaktivierung der Infektiösität wurde anschließend im Plaquereduktionstest überprüft.

3.7 Selektion mittels Kapillarelektrophorese

3.7.1 Vorbereitende Experimente

Vorbereitung der RNA

Um eine reproduzierbare Faltung der einzelnen RNA-Moleküle in allen anstehenden Experimenten zu gewährleisten, wurde der RNA-Pool vor jedem Versuch re- und denaturiert. Dafür erfolgte eine Entfaltung für 10 min bei 70 °C im Thermocycler und eine anschließende Rückfaltung für 30 min bei der eigentlichen Selektionstemperatur von 41 °C in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$.

Vorbereitung der Kapillare

Vor der Verwendung der georderten Kapillare musste diese zunächst mit einem Fenster für die Erfassung von Kapillarvolumen durch den Detektor des Gerätes versehen werden. Dafür wurde die Kapillare erst vermessen und auf Höhe des Detektors so stark erhitzt, dass sich ihre Ummantelung ablöste. Das auf diese Weise hergestellte Messfenster wurde mit Aceton von Russrückständen befreit.

Nach dem Einbau der Kapillare in das Gerät wurden zunächst Waschprogramme mit steril filtriertem *Aqua dest.* absolviert, um Beschädigungen und Verunreinigungen im Inneren der Kapillare zu entfernen und sie auf ihre prinzipielle Funktionstüchtigkeit zu überprüfen. Im Anschluss konnte unter Verwendung von steril filtriertem Selektionspuffer eine konstante Basislinie produziert werden. Alle Probe- und Selektionsläufe fanden bei einer Umgebungstemperatur der Kapillare von 30 °C statt, um eine physiologische Körpertemperatur zu imitieren, so gut wie möglich zu nutzen. Außerdem wurde die Wellenlänge der Detektion für jeden Lauf bei 200 nm und die einzusetzende Spannung auf 15 kV festgelegt.

3.7.2 Darstellung von RNA durch Kapillarelektrophorese

Vor jeder Selektion musste zunächst die Unversehrtheit und die Darstellbarkeit des RNA-Pools gewährleistet werden. Dazu wurden in unterschiedlichen Durchgängen verschiedene Konzentrationen an RNA-Lösung bei positiver Polarität des Gerätes injiziert. In den genannten Fällen wurde die Anode der Kapillarelektrophorese auf die Detektorseite und die Kathode auf die Auftragsseite gelegt, wodurch eine rasche Vorwärtsbewegung der negativ geladenen RNA-Moleküle erreicht werden konnte. Nur bei eindeutiger Reproduzierbarkeit von Retentionszeit und Signalstärke der aufgetragenen Probe waren die Vorraussetzungen für den eigentlichen Selektionslauf erfüllt.

3.7.3 Darstellung der Zielmoleküle durch Kapillarelektrophorese

Die Auswahl eines möglichen Zielmoleküls für CE-SELEX hängt entschieden von der Darstellbarkeit des Moleküls in der Kapillarelektrophorese ab. Deswegen wurden alle einzusetzenden Proben vor jedem Selektionslauf alleine in das Gerät injiziert.

Darstellung des Virus Cu-1

Die Ausgangslösung der gereinigten Viruscharge wurde mit Selektionspuffer A auf 10.000 Viruspartikel in 50 nl verdünnt. Diese Konzentration wurde in den folgenden Experimenten zur Selektion eingesetzt. Die Polarität der CE wurde entsprechend der Darstellung des RNA-Pools gewählt. Ein erfolgreicher Vorversuch war ebenfalls durch wiederholbare Retentionszeit und Signalstärke des Peaks, sowie durch eine - vor und nach dem Probenpeak zu beobachtende - konstante Basislinie gekennzeichnet.

Darstellung des VP2

Analog zur Darstellung des Virus wurden die Bedingungen an das Gerät und die Pufferzusammensetzung gewählt. Hinsichtlich der Konzentration der Proteinlösung wurde von der Konzentration der Virussuspension abgewichen, um eine ähnliche Verteilung an VP2 wie auf dem Virus zu erreichen. Da ein Viruspartikel in etwa 11.400 Kopien des VP2 auf seiner äußeren Oberfläche trägt, wurde die Proteinlösung so eingestellt, dass sich in 50 nl 11.400 x 10.000 Proteinteilchen befanden. Nach reproduzierbaren Probeläufen, die die gleichen Charakteristika wie die Läufe der RNA und des Virus beinhalten mussten, war auch dieses Zielmolekül für eine Selektionsrunde einsatzbereit.

3.7.4 Durchführung einer Selektion mittels Kapillarelektrophorese

Vorbereitung des RNA-Pools

Vor jedem Selektionslauf musste der RNA-Pool so vorbereitet werde, dass eine identische Konformation der einzelnen Moleküle gegeben war. Erreicht wurde dies durch einen Denaturierungsschritt der einzusetzenden RNA-Probe für 10 min bei 70°C im Thermocycler, Zugabe von $MgCl_2$ und 30 min Renaturierung dieser Probe auf 41 °C im Thermomixer. Die somit aufbereiteten RNA-Moleküle konnten nun mit dem Zielmolekül inkubiert werden.

Inkubation von RNA-Pool und Zielmolekül

Nach Vorbereitung des Pools wurde dieser mit dem Virus für 30 min bei 41 °C im Thermomixer inkubiert. In dieser Phase des Experiments sollte es zur Anlagerung von RNA-Molekülen an die Viruspartikel und dadurch zur Ausbildung von RNA-Virus-Komplexen kommen. Nach halbstündiger Inkubation war die eigentliche Lösung, die in die Kapillarelektrophorese eingegeben werden sollte, einsatzbereit.

Eine Inkubation von Pool mit VP2-Lösung wurde identisch zur beschriebenen Vorgehensweise mit Virus durchgeführt.

Durchführung eines Selektionslaufs

Nach vorangegangenen Versuchen zur Gewährleistung der Funktionstüchtigkeit des Gerätes konnten nun die einzelnen Parameter der gewünschten Selektionsbedingungen entsprechend gewählt werden. Als besondere Auffälligkeit ist die Umkehr der Polarität zu verzeichnen, bei der nun, konträr zum Probelauf, die Kathode auf der Detektorseite und die Anode auf der Seite der Probeneingabe festgelegt wurde. Die übrigen Parameter für den Selektionslauf betrugen einheitlich 30 °C für die Geräteinnentemperatur, 200 nm Wellenlänge für den Detektor und 15 kV Gerätespannung.

Auf Grundlage der Kapillardaten wurde eine Flussgeschwindigkeit von 3,3 nl/s berechnet. Um das gewünschte Auftragsvolumen der RNA-Viruslösung von 50 nl zu erreichen, musste also eine Injektion der Probe über einen Zeitraum von 15 s vorgenommen werden. Nach der

hydrodynamischen Injektion wurde die Spannung angelegt und der Stromkreislauf durch Selektionspuffer B auf beiden Seiten der Kapillare geschlossen.
Anhand der angeschlossenen Software konnte der Selektionslauf auf einem Rechner mitverfolgt werden. Bei Auftreten eines prominenten Peaks wurde der Lauf sofort unterbrochen. Ein 0,2 ml Gefäß mit 31,5 µl *Aqua dest.* wurde nun anstatt des Pufferreservoirs auf der Detektorseite justiert und die Kapillare mit Luft gespült. Bei diesem Vorgang konnte das gesamte noch in der Kapillare verbliebene Volumen aufgefangen werden. Der gewonnenen RNA-Viruslösung wurde 1 µl 3'-Primer [100 µM] zugesetzt. Diese Lösung wurde nun einer Hybridisierungsreaktion zugeführt.
Dieser Lauf wurde noch mehrmals wiederholt, um die Reproduzierbarkeit dieses Peaks abzusichern. Nach jedem Lauf wurde die Kapillare mit Selektionspuffer B gespült, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen.

3.8 Filterbindungstests

Um selektierte RNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit zu überprüfen, wurden Filterbindungstests mit verschiedenen Zielmolekülen und radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Die Markierung der RNA mit [γ^{32}-P]-ATP und alle anschließenden radioaktiven Bindungsstudien wurden in einem Isotopenlabor durchgeführt. Dabei mussten Personen- und Fingerdosimeter getragen werden.

3.8.1 Dephosphorylierung von RNA unter Verwendung von CIAP

Für die Dephosphorylierung von 5'-Enden der gereinigten RNA-Moleküle inkubierte man 10 - 200 pmol RNA mit 4 U alkalischer Phosphatase für 45 min bei 37 °C.

Dephosphorylierungsansatz:	RNA	20 pmol
	CIAP-Puffer (10x)	5 µl
	CIAP [1U/µl]	4 µl
	RNase-Inhibitor [40U/µl]	1 µl
	Aqua dest. ad(DEPC-behandelt)	50 µl

Anschließend wurde die Phosphatase nach Erhöhung des Gesamtvolumens auf 150 µl mit DEPC-behandeltem *Aqua dest.* durch Phenol/Chloroform-Extraktion inaktiviert, die wässrige Phase abgenommen und mit Ethanol präzipitiert.

3.8.2 Radioaktive Markierung von RNA

Die T4-Polynucleotidkinase (PNK) ermöglicht, Oligonucleotide am 5'-Hydroxylende radioaktiv zu markieren. Bei dieser Form der Phosphorylierung wird das γ-Phosphat des [γ^{32}-P]-ATPs mit dem 5'-Hydroxylende des Oligonucleotides verestert. Um eine Inhibition der Polynucleotidkinase durch Verunreinigungen und Kontaminationen zu verhindern, wurde die dephosphorylierte RNA-Lösung mit Ethanol gefällt und anschließend in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Phosphorylierungsansatz:	dephosphorylierte RNA	10 µl
	PNK-Puffer A (10x)	2 µl
	ATP [10 µM]	1 µl
	Aqua dest. ad (DEPC-behandelt)	18 µl
Zugabe im Isotopenlabor von:		
	[γ^{32}P]-ATP (9,25 mBq)	1 µl
	Polynucleotidkinase [10U/µl]	1 µl

Die Markierung wurde für 30 min bei 37 °C im Isotopenlabor durchgeführt. Nach der Inkubation erfolgte eine Reinigung der RNA mittels Micro Bio Spin Columns (Biorad, München, D), nachdem die Säulchen zuvor mit 4x 500 µl Selektionspuffer A nach Anleitung des Herstellers äquilibriert worden waren. Am Ende der Reinigung konnten pro Probe etwa 35 µl markierte und gereinigte RNA erhalten werden.

3.8.3 Vorbereitung der markierten Nucleinsäure

Als Voraussetzung für jeden Filterbindungsversuch wurde die radioaktiv markierte RNA-Probe für 10 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert und in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$ für 30 min bei 41 °C renaturiert, um bei jedem Versuch eine identische Faltung des jeweiligen RNA-Moleküls zu gewährleisten.

3.8.4 Inkubation von RNA und Target

Gefaltete RNA wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Ziel- bzw. Kontrollmolekülen inkubiert, um eine Bindungsfähigkeit, die Bindungsspezifität und deren Stärke zu determinieren. Dazu wurden die unterschiedlich kombinierten Lösungen immer für 30 min bei 41 °C im Thermomixer inkubiert und erst danach dem eigentlichen Filterbindungstest unterzogen.

3.8.5 Filterbindungstest mit RNA und Target, bzw. Kontrollen

Die inkubierte RNA-Target-Lösung wurde auf eine Filterplatte (Millipore, Schwalbach, D) aufgebracht, nachdem die zu benutzenden Vertiefungen dieser Platte zuvor mit je 250 µl Selektionspuffer B äquilibriert worden waren. Dazu wurde der Puffer in die Vertiefungen pipettiert und die Platte sofort für 2 min bei 4.000 g zentrifugiert. Die Filter dieser Platte bestehen aus einem Zellulosegemisch, an das Proteine binden. Unter die Filterplatte konnte eine ELISA-Platte angebracht werden, welche die durch Zentrifugation verdrängte Lösung auffing. Da das Inkubationsvolumen der zu untersuchenden Probe mit 4,5 µl nicht geeignet für einen Filterbindungstest war, musste das Volumen jeder Probe vor dem Auftragen auf den Filter mit Selektionspuffer B auf insgesamt 50 µl eingestellt werden. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt für 1 min bei 4.000 g wurden in jede benutzte Vertiefung zusätzliche 250 µl Selektionspuffer B eingefüllt und analog zentrifugiert, sodass nach Durchführung des eigentlichen Bindungstests jede Probe in einem Volumen von 300 µl in der unterlegten ELISA-Platte zu finden war.

3.8.6 Messung der Radioaktivität mittels Szintillationszähler

Die nach dem Filterbindungstest erhaltene Lösung konnte sofort im Szintillationszähler vermessen werden, wobei die Proben allerdings zunächst mit je 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und in geeignete Reaktionsgefäße überführt werden mussten. Ein angeschlossenes Druckersystem zeichnete die Messwerte in Zählern pro Minute *(counts per minute)* auf, welche später mit Microsoft Excel eingehend analysiert werden konnten.

3.9 Plaquereduktionstests

Sowohl für die Titerbestimmung des Saatvirus, den Nachweis der Inaktivierung gereinigter Viruschargen, als auch für den Nachweis einer Reduktion von Plaques durch Bindung von Aptameren an das infektiöse Virus, wurden Plaquereduktionstests angewendet.

3.9.1 Herstellung der Zellkultur

Primäre Zellkulturen aus HEF für die Durchführung der Plaquereduktionstests wurden nach Standardmethoden aus zehn Tage bebrüteten Hühnerembryonen unter sterilen Bedingungen hergestellt (Dulbecco und Vogt, 1954; Youngner, 1954). Dabei wurden die Eier desinfiziert und auf Höhe der Luftkammer eröffnet, um die Embryonen unbeschädigt entnehmen zu können. Nachdem die Extremitäten und alle inneren Organe entfernt wurden, fanden eine Zerkleinerung des restlichen Bindegewebes und zwei separate Waschvorgänge in je 10 ml 1x PBS statt. Nach Filtration der grob gesäuberten Zellsuspension durch sterile Gaze wurde das Filtrat in fetalem Kälberserum aufgenommen und mit Kulturmedium auf die erforderliche

Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen je ml Suspension eingestellt. Die Zellkonzentration konnte mit Hilfe einer Trypanblaufärbung und der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Anschließend wurde die verdünnte Zellsuspension in Kulturschalen ausgesät und bis zur Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (Monolayer) bei 38 °C im Brutschrank inkubiert. Die entstandene Primärkultur konnte nachfolgend zur Virusvermehrung und für Plaquereduktionstests verwendet werden.

3.9.2 Stabilitätstest von Nucleinsäuren

Für die nach einer erfolgreichen Selektion durchzuführenden Virusneutralisationstests musste eine gewisse Stabilität der Aptamere gesichert sein. Deswegen wurden im Vorfeld Untersuchungen der RNA-Moleküle in 1x PBS über verschieden Zeiträume unternommen. Dafür wurde die Endkonzentration der RNA auf 190 nM zuvor eingestellt und die RNA-Lösung re- und in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ denaturiert (vgl.3.7.1). Im Anschluss daran wurde die RNA bei 37 °C für 30 min, 60 min und 120 min in ca. 10 µl 1x PBS inkubiert. Danach wurden alle Proben in einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert.

3.9.3 Virusneutralisationstests

Um die Fähigkeit selektierter RNA-Moleküle bezüglich ihrer Neutralisation infektiöser Viruspartikel zu beurteilen, wurden Virusneutralisationstests (VNT) durchgeführt, bei denen es sich um eine Abwandlung des Plaquereduktionstests handelt. Zum Einsatz kamen HEF-Primärkulturen, CsCl-gradientengereingtes IBDV (Stamm Cu-1) mit einem Titer von 2,2 x 10^7 Plaques pro ml Virussuspension und gereinigte RNA. Zunächst musste das infektiöse Virus soweit verdünnt werden, dass in einer Positivkontrolle entstehende Plaques auswertbar waren. In diesem konkreten Fall entsprach dies in etwa einer 1:2000 Verdünnung der Virusstammlösung. Die Verdünnung fand in Kulturmedium statt und wurde bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Des Weiteren mussten die zu testenden Aptamere in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:2) vorbereitet werden, wofür jede Probe entsprechend in 1x PBS verdünnt wurde.

Positivkontrolle:	ohne Virus
Negativkontrolle	ohne Ak
Antikörperkontrolle (mk):	mit Virus und mAk
Antikörperkontrolle (pk):	mit Virus und pAk
RNA-Kontrolle (mit RNase A verdaut):	mit vorher verdauter RNA und Virus

Für die erforderlichen Kontrollen wurden je zwei Kulturschalen pro Titrationsstufe nur mit 1x PBS (Positivkontrolle), nur mit Virus (Negativkontrolle), mit Virus und Antikörper (Antikörperkontrollen) oder vor der Infektion enzymatisch verdauter RNA (RNA-Kontrolle) infiziert. Der weitere Verlauf des VNT entspricht dem Plaquereduktionstest, wobei jede Schale vor der Infektion mit 2 ml 1x PBS gewaschen und danach mit 0,2 ml Suspension infiziert wurde. Die Schalen wurden nun für 1 h bei 38 °C unter intermittierendem Schütteln inkubiert, die Viruslösungen vorsichtig abgenommen und verworfen und jede Schale mit 4 ml halbfestem Medium überzogen. Nach dem Erstarren des so genannten Overlays I wurden die Platten für drei Tage in den Brutschrank (37 °C) gestellt. Am dritten Tag nach dem ersten Teil des VNT erfolgte eine Überschichtung der Zellen mit Overlay II. Alle Platten wurden nochmals für 3 h bei 38 °C inkubiert und darauf folgend in der Dokumentationsanlage hinsichtlich der Anzahl der vorhandenen Plaques bewertet. Die so erhaltenen Daten konnten weiter mit Microsoft Excel ausgewertet werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Reinigung der Zielmoleküle

Vor der eigentlichen Selektion mussten die gewünschten Zielmoleküle separat produziert und gereinigt werden. Es wurden nur erwiesenermaßen homogene und reine Präparationen für Selektions- und Bindungsexperimente verwendet.

4.1.1 Vermehrung und Reinigung des Virus

In eigens dafür hergestellten HEF-Kulturen wurde der deutsche IBDV-Stamm Cu-1 über 1,5 Tage vermehrt. Anschließend konnte über wiederholte Frier-Tau-Prozesse die gesamte Zellsuspension leicht von den Platten entfernt und zentrifugiert werden. Im Überstand befand sich nun das infektiöse Virusmaterial, dessen Titer in einem Plaquereduktionstest ermittelt werden konnte. Nach extensiver Zentrifugation erhielt man ein virushaltiges Pellet, das mit Ultraschall und Frigen behandelt wurde. Um absolut reine Viruspartikel zur Verfügung zu haben, schlossen sich Zentrifugationsschritte in einer Ultrazentrifuge, unter Verwendung eines CsCl-Gradienten, an. Mit Hilfe dieser Methode konnten darauf folgend einzelne Banden dargestellt werden. Dafür wurden Virusbanden unter lokaler Beleuchtung des Zentrifugationsgefäßes in einem abgedunkelten Raum sichtbar gemacht. Die verschiedenen Banden der einzelnen Versuchsabschnitte wurden miteinander vereinigt und pelletiert. Das nun gereinigt vorliegende Viruspellet konnte in 1x PBS resuspendiert, mittels UV-Licht inaktiviert werden und stand für nachfolgende Experimente zur Verfügung.

4.1.2 Plaquereduktionstest zum Nachweis der Virusinaktivierung

Als Voraussetzung für weitere Versuche in Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 musste ein Nachweis der Inaktivierung jeder gereinigten Viruscharge erfolgen. Dafür wurde ein Plaquereduktionstest (vgl. 3.6.3) durchgeführt, wobei vor und nach der Inaktivierung des Virus durch UV-Licht ein Aliquot entnommen, sein Volumen mit 1x PBS auf 200 µl erhöht und anschließend für 1 h bei 38 °C unter intermittierendem Schwenken im Brutschrank inkubiert wurde. Nach Verwerfen des Inokulums wurden die Platten mit halbfestem Medium überschichtet, über drei Tage bei 38 °C inkubiert und angefärbt.
Bild 4-1 zeigt zwei dieser Platten, nachdem sie mit der Geldokumentationsanlage photografiert worden waren.

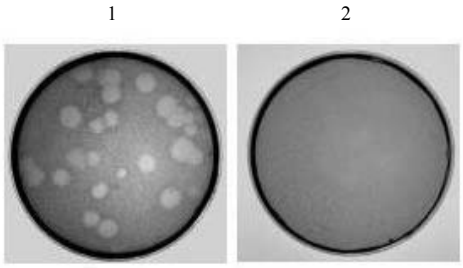

Bild 4-1: Mit Neutralrot angefärbte HEF-Kulturen

1: kreisrunde Plaques als Kennzeichen lokaler Virusvermehrung vor der Behandlung der Viruspräparation mit UV-Licht; 2: geschlossener Zellrasen als Beweis für eine erfolgreiche Inaktivierung des Virus

Die dem auf Platte 2 aufgetragenen Aliquot entsprechende Viruscharge konnte in weiteren Experimenten in S1 Laboratorien genutzt werden.

4.1.3 SDS-PAGE zum Nachweis der Reinheit der Viruspräparation

Als Kontrolle der erfolgreichen Reinigung der Viruscharge wurde eine kleine Menge des Virus auf ein 12 % SDS-Gel (vgl. 3.5.2) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. In einer anschließenden Coomassie-Färbung konnte das Virus als reine Präparation dargestellt werden (Bild 4-2).

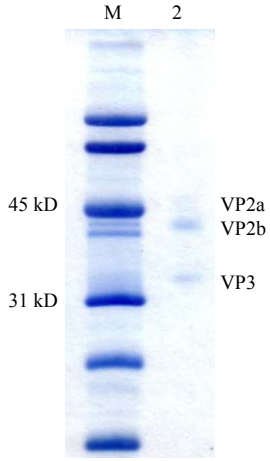

Bild 4-2: Gelelektrophoretische Analyse der konzentrierten und gereinigten Viruspräparation

Coomassie-Färbung eines 12 % SDS-Gels, M: 4 µl Precision Plus Protein Unstained Standard; 2: 1 µl Virus; deutlich sichtbar sind drei Banden auf Höhe des unprozessierten VP2a, des in reifen Viruspartikeln dominanten VP2b und des zweiten Strukturproteins VP3

4.1.4 Gentechnische Produktion und Reinigung von VP2 in *E.coli*

Klonierung und Transformation

Ziel der angewandten Klonierungsstrategie war die Herstellung eines DNA-Klones, der die vollständige Sequenz des VP2 des deutschen IBDV-Stammes Cu-1 inklusive zweier Tags zur vereinfachten Reinigung und Identifizierung des rekombinanten Proteins beinhalten sollte. Zusätzlich sollten die fusionierten Tags später mittels Behandlung mit der AcTEV™ Protease abgespaltet werden, weswegen zwischen Proteinsequenz und Tags eine Erkennungssequenz

für dieses Enzym eingefügt wurde. Der Vorteil dieses Konstruktes war in der einfachen Reinigung des rekombinanten Proteins, den unterschiedlichen Nachweismöglichkeiten durch die beiden Tags und in der Möglichkeit der Herstellung der nativen Form des Proteins für beispielsweise Kristallisationsversuche eindeutig zu erkennen. Allerdings erforderte ein solches Konstrukt eine intensive Planung und Durchführung des Klonierungsexperimentes, welches sich aus verschiedenen Teilen zusammensetzte (Bild 4-3 und Bild 4-7).

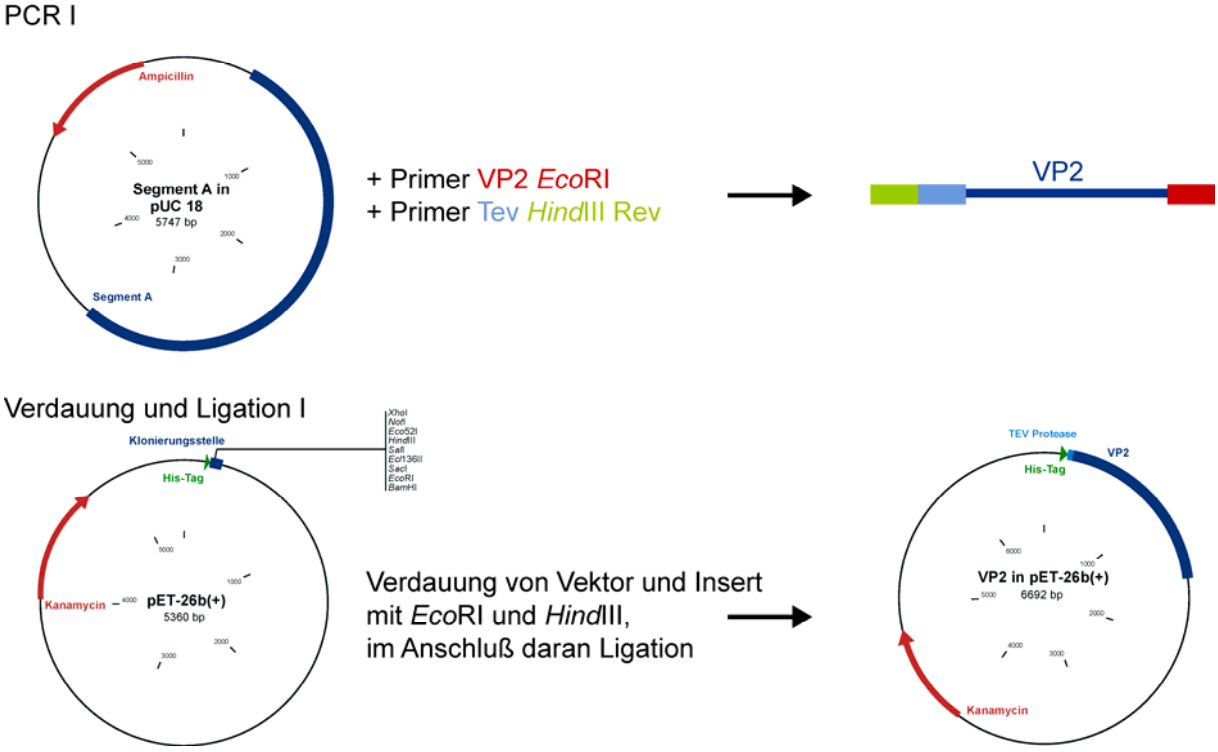

Bild 4-3: Schema der PCRI, Verdauung von Vektor pET-26b(+) und Insert, sowie deren Ligation miteinander

In einer ersten PCR (PCR I) wurde die komplette Sequenz des VP2 vervielfältigt, wobei das Segment A des Stammes Cu-1 als Template diente. Nach erfolgreicher PCR erhielt man ein Produkt mit einer Größe von 1.365 bp (Bild 4-4).

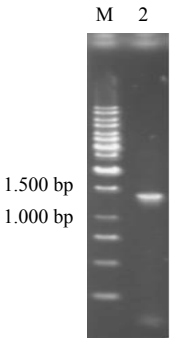

Bild 4-4: Analytisches 1 % Agarosegel zur Überprüfung der PCR I

Gefärbt mit Ethidiumbromid; M: 4 µl 1 kb DNA Ladder; 2: 1 µl PCR-Produkt

Die durch die beiden Primer VP2 *Eco*RI Fw und Tev *Hind*III Rev eingefügte Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsendonucleasen konnten benutzt werden, um die

amplifizierte DNA und den Expressionsvektor pET-26b(+) analog zu schneiden und anschließend miteinander zu ligieren. Bild 4-5 zeigt ein Agarosegel, auf dem die geschnittene Vektor- und Insert-DNA im Vergleich getrennt wurden. Diese beiden Proben wurden für die anschließende Ligation verwendet.

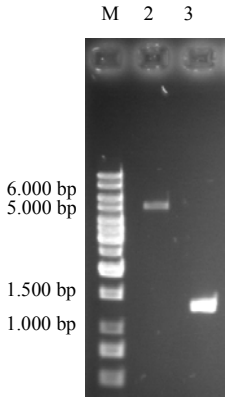

Bild 4-5: 1 % Agarosegel zum direkten Vergleich der zu ligierenden DNA-Moleküle

M: 4 µl 1 kb DNA Ladder; 2: 1 µl pET-26b(+)-DNA, mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut; 3: 1 µl PCRI-Produkt, mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut; Ethidiumbromidfärbung

Das resultierende Plasmid wurde in einer zweiten PCR (PCR II) als Matrize für die Primer VP2 *Eco*RI Fw und *Hind*III Myc Rev eingesetzt. Eine Verdauung des generierten Produktes mit dem Enzym *Sac*I resultierte in zwei unterschiedlich großen Fragmenten, von denen das größere für eine weitere Ligation verwendet wurde. Als Ligationspartner wurde das aus der ersten PCR und dem Vektor pET-26b(+) generierte Plasmid VP2 in pET-26b(+) ebenfalls mit *Sac*I geschnitten, wobei abermals zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente entstanden. Die zu ligierenden, verdauten und gereinigten DNA-Moleküle wurden nochmals gelelektrophoretisch analysiert (Bild 4-6).

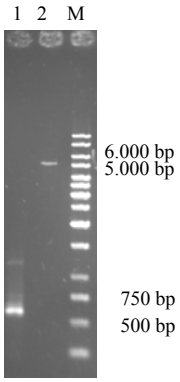

Bild 4-6: Analytisches 1 % Agarosegel zur Überprüfung der geschnittenen und gereinigten DNA-Proben

1: 1 µl PCR II-Produkt, mit *Hind*III und *Sac*I verdaut; 2: 1 µl Plasmid VP2 in pET-26b(+), mit *Hind*III und *Sac*I verdaut; M: 4 µl 1 kb DNA Ladder; Ethidiumbromidfärbung

Durch Ligation des größeren Verdauungsproduktes aus VP2 in pET-26b(+) mit dem ebenfalls größeren Fragment des geschnittenen Produktes nach der PCR II konnte die vollständige

Sequenz des VP2 inklusive Erkennungssequenz für die AcTEV™ Protease und Myc-Tag in den Expressionsvektor pET-26b(+) erhalten werden (Bild 4-7).

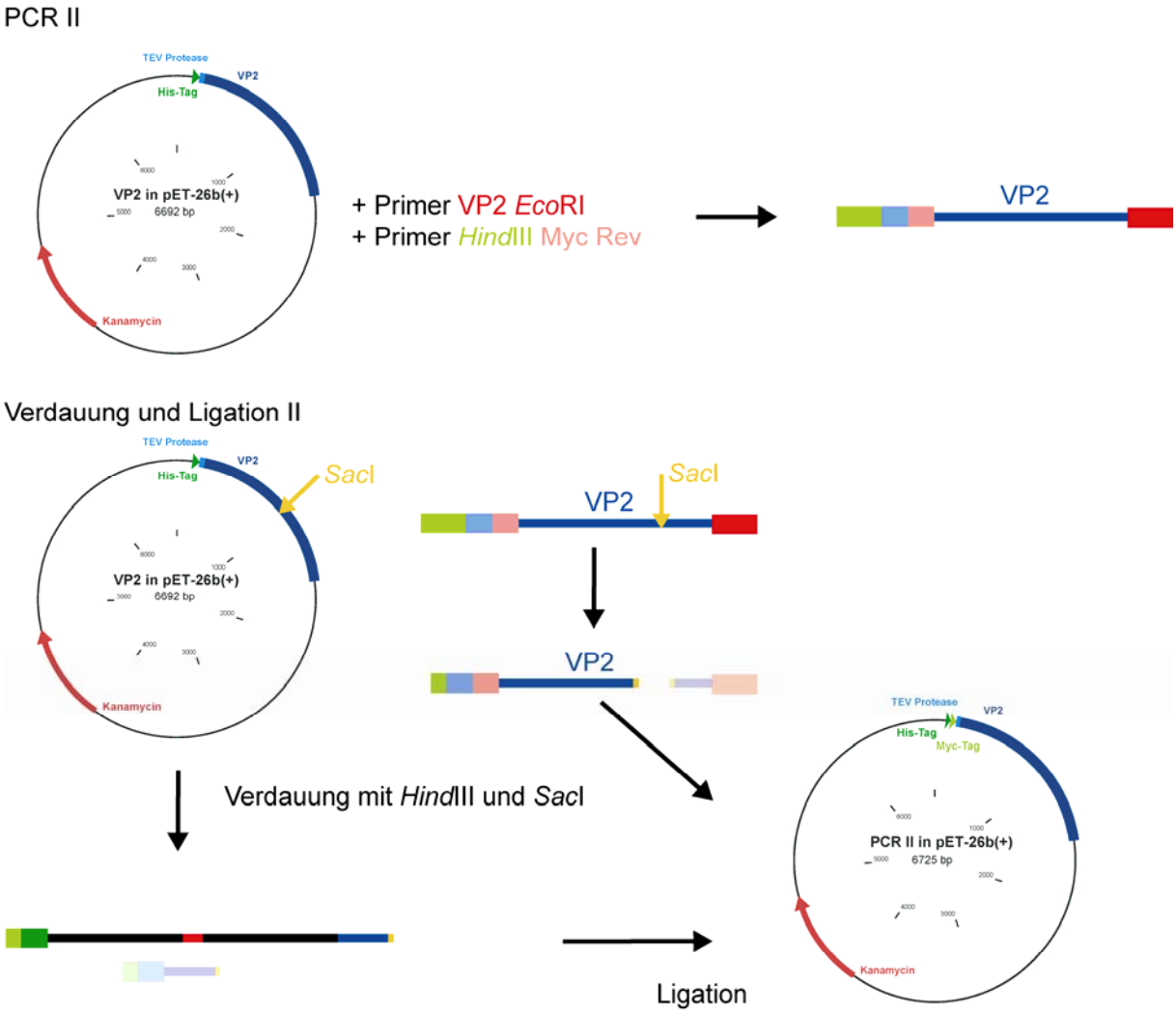

Bild 4-7: Schema der PCR II, Verdauung der finalen Ligationspartner, sowie deren Ligation

Die Klonierungsbedingungen waren so gewählt, dass gentechnisch produziertes VP2 zusätzlich durch das ursprünglich aus dem Vektor stammende His-Tag charakterisiert war.
An diese zweite Ligation anschließend wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen des Stammes *BL21*(DE3)pLysS mit dem Ligationsansatz transformiert und über Nacht ausgestrichen. Eine Einzelkolonie dieser Transformation konnte nun für die Herstellung einer Übernachtkultur mit einem Volumen von 3 ml benutzt werden.

Produktion und Reinigung des VP2

Mit Hilfe von 2 ml der Übernachtkultur wurde ein Volumen von 200 ml angeimpft und über mehrere Stunden hinweg kultiviert. In vorangegangenen Versuchen konnte die optimale Temperatur von 24 °C und die IPTG-Konzentration von 1 mM für eine erfolgreiche Produktion ermittelt werden. Nach der Expression wurde die Zellsuspension mehrmals zentrifugiert, sonifiziert und über Nacht in Anwesenheit von 8 M Harnstoff geschüttelt. Eine Inkubation der grob gereinigten Proteinlösung mit Ni-NTA-Matrix der Firma QIAGEN

(Hilden, D) ermöglichte die Bindung des Zielproteins an die Matrix über das His-Tag. Durch den Zusatz von 20 mM Imidazol zu dieser Lösung sollten unspezifische Wechselwirkungen zwischen Matrix und unerwünschten Proteinen unterbunden werden.

Die Affinitätschromatographie erfolgte am nächsten Tag durch Beladung einer Chromatographiesäule der Firma BioRad, die in der Glasbläserei des Fachbereichs Chemie auf die gewünschte Länge von 7 cm verkürzt worden war. Nach mehreren Waschschritten erfolgte schließlich die Elution der gebundenen Proteine in Gegenwart von 300 mM Imidazol. Alle erhaltenen Fraktionen konnten nun hinsichtlich ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm analysiert und auf ihren Gehalt an Protein hin eingegrenzt werden (Bild 4-8).

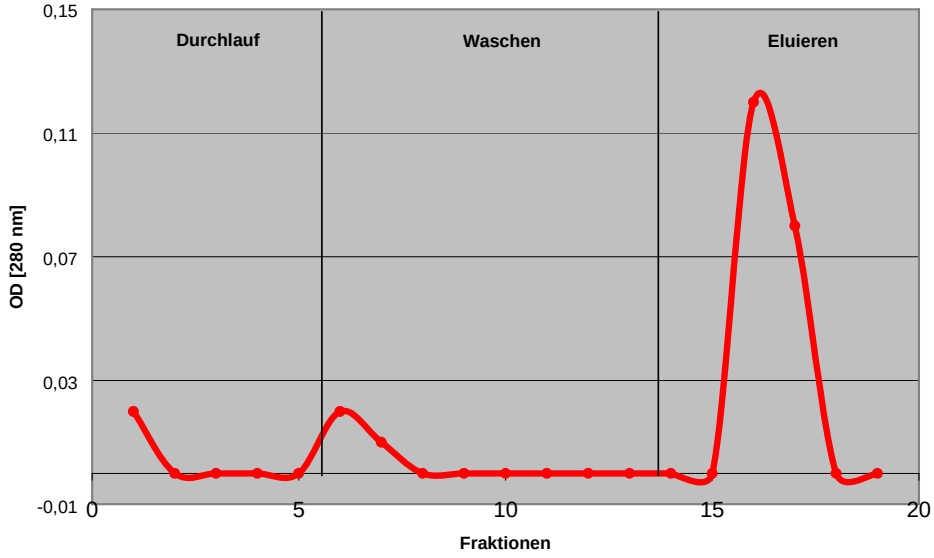

Bild 4-8: Elutionsprofil der einzelnen Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen nach Reinigung von rekombinantem VP2

Ein deutlicher Anstieg der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm war in der zweiten und dritten Elutionsfraktion zu verzeichnen

Anhand des ermittelten Elutionsprofils wurden einzelne Fraktionen für weitere Untersuchungen mittels SDS-PAGE ausgewählt. Nach der Trennung der einzelnen Proben durch die Gelelektrophorese wurde eine Coomassie-Färbung über Nacht angeschlossen (Bild 4-9). Nach dem Entfärben des Gels über einen Zeitraum von einer Stunde konnten in der zweiten und dritten Elutionsfraktion dem gereinigten Protein entsprechende Banden nachgewiesen werden, wohingegen in der Waschfraktion keine Banden zu detektieren waren.

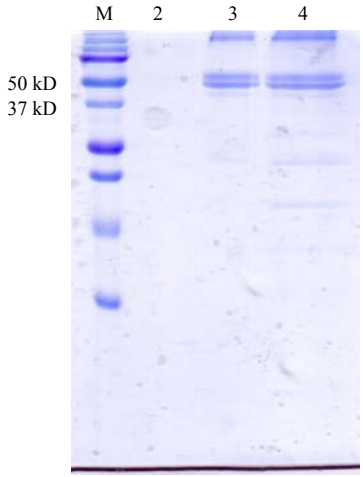

Bild 4-9: 12 % SDS-Gel nach Coomassie-Färbung des Trenngels

M: 4 µl Precision Plus Protein Dual Standard; 2: 16 µl der Fraktion 6 aus dem Elutionsprofil, entspricht der zweiten Waschfraktion; 3: 16 µl der Fraktion 16 des Elutionsprofil, entspricht der zweiten Elutionsfraktion; 4: 16 µl der Fraktion 17 des Elutionsprofil, entspricht der dritten Elutionsfraktion

Die Proteinproben, die nach dem Entfärben des Gels reine Banden auf der zu erwartenden Höhe von ca. 50 kDa aufwiesen, wurden einer immunochemischen Analyse mittels Western Blot unterzogen. Dabei wurde dieser Blot dreifach ausgeführt, wobei jeweils andere primäre Antikörper eingesetzt wurden. So kamen der monoklonale IBDV-spezifische Antikörper II/C3, ein Anti-His(C Term)Antikörper und ein Anti-myc Antikörper (beide Invitrogen, Karlsruhe, D) zur Anwendung. In diesen drei Verfahren wurde jeweils der Antikörper anti-mouse-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D) als sekundärer Antikörper verwendet. Eine Überprüfung der gentechnisch produzierten und gereinigten Proteinfraktionen mit IBDV-spezifischem polyklonalem Serum B54 wurde anfangs ebenfalls durchgeführt, wobei der Antikörper anti-rabbit-IgG-AP-Konjugat (Sigma, Taufkirchen, D) als zweiter Antikörper zur Detektion diente.

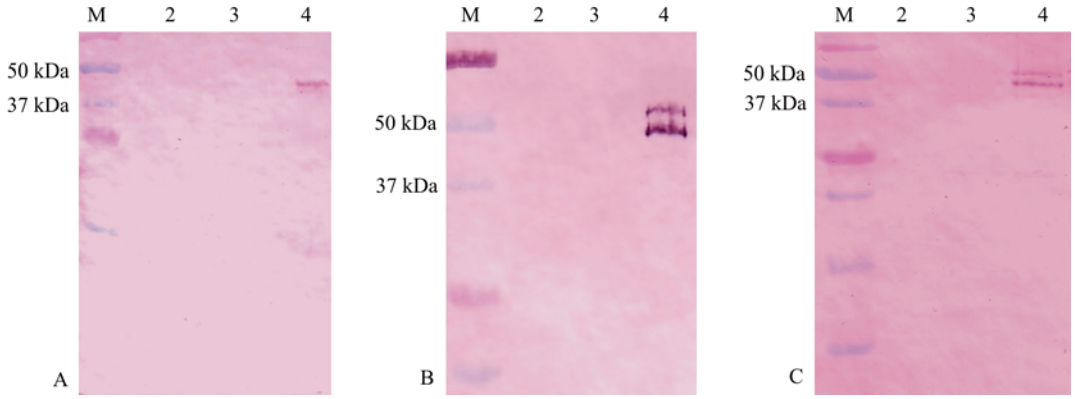

Bild 4-10: Western Blot von ausgewählten Proteinfraktionen nach Reinigung durch Affinitätschromatogaphie

A: Detektion mit mAk II/C3; B: Detektion mit Anti-His(C Term)Ak; C: Detektion mit Anti-myc Ak; M: 4 µl Precision Plus Protein Dual Standard; 2: 16 µl der zweiten Waschfraktion; 3: 16 µl der zweiten Elutionsfraktion; 4: µl der dritten Elutionsfraktion

Eine Kontrollexpression unter identischen Bedingungen von untransformierten *BL21*(DE3)pLysS Zellen und deren Überprüfung mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung

und Western Blot konnte eine zufällige Präsenz eines in diesem Zellstamm vorhandenen Proteins von gleicher Größe und mit ähnlichen Eigenschaften ausschließen.
Durch den Nachweis von Banden der erwarteten Größe nach der Coomassie-Färbung (vgl. Bild 4-9) konnte die erfolgreiche Produktion und Reinigung des Zielproteins belegt werden. In den drei anschließenden Western Blots wurde dieses Protein mit dem für IBDV spezifischen mAk und den für die eingeführten Tags spezifischen Ak detektiert. Somit konnte eine erfolgreiche Herstellung und Reinigung des VP2 bewiesen werden.

4.2 Herstellung des RNA-Pools

Die *in vitro* Selektion von funktionellen Nucleinsäuren benötigt eine Bibliothek, die teilweise randomisiert ist und Moleküle mit bis zu 10^{16} individuellen Sequenzen beinhaltet. Um eine geeignete RNA-Bibliothek zu erzeugen, muss zunächst ein optimales DNA-Templat konzipiert und synthetisiert werden.
In dieser Arbeit wurde ein einzelsträngiger DNA-Pool, der von der Firma IBA (Göttingen, D) bezogen wurde und bereits am Institut vorhanden war, verwendet. Dabei handelte es sich um unmodifizierte, einzelsträngige DNA mit einer Gesamtlänge von 109 Basen. Der randomisierte Bereich mit 40 Nucleotiden wurde von zwei invariablen Bindungsregionen für Primer flankiert, um eine enzymatische Amplifikation durch reverse Transcription und PCR zu ermöglichen. Das ssDNA-Templat beinhaltete bereits den T7-Promotor, der durch einen einzigen Amplifikationszyklus doppelsträngig wurde und somit einer anschließenden Transcription in RNA zur Verfügung stand (Bild 4-11). Die doppelsträngige DNA zeigte in nativen Gelen ein anderes Laufverhalten als die einzelsträngige Ausgangs-DNA.

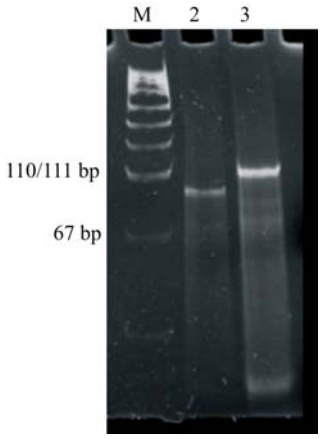

Bild 4-11: Gelelektrophoretische Analyse der mittels Fill-in-Reaktion hergestellten dsDNA

10 % natives Polyacrylamidgel, mit Ethidiumbromid gefärbt, M: 2 µl pUC19/MspI; 2: 1 µl ssDNA Pool SK; 3: 1 µl Fill-in-Ansatz

Des Weiteren war der ssDNA-Pool durch zwei Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *Eco*RI und *Pst*I gekennzeichnet, die eventuell für die Herstellung von selektierten Bindern eingesetzt werden konnten. Nach Umschreibung in RNA enthielt die entsprechende Sequenz zudem an der Initiationstelle der reversen Transcription Purinbasen.

Diese Anreicherung von Purinen förderte die Polymerisationsreaktion der reversen Transcriptase.

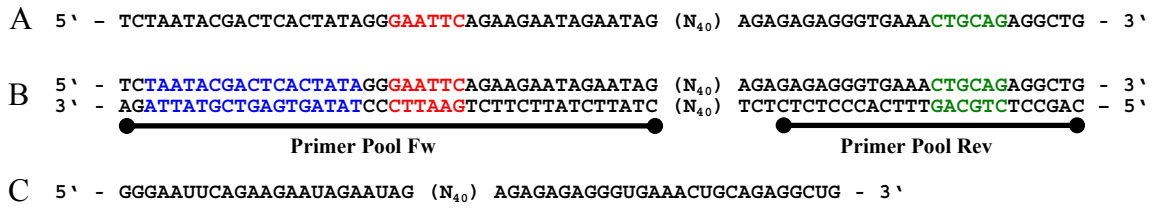

Bild 4-12: Darstellung der kombinatorischen DNA- bzw. RNA-Bibliothek

A: chemisch synthetisierte ssDNA-Bibliothek mit einer Länge von 109 Basen. B: mittels Fill in hergestellter dsDNA-Pool, Bindungstellen für Primer sind entsprechend gekennzeichnet. C: Sequenz der der Selektion zur Verfügung stehenden RNA-Bibliothek (90 b)

Ziel in diesem Schritt war es, eine ausreichend große Menge an reiner RNA zu erhalten, die danach für einzelne SELEX-Experimente zur Verfügung stehen sollte. Mit einer einzigen Fill-in-Reaktion konnte aus 5 nmol ssDNA das gewünschte dsDNA-Templat hergestellt werden, welches anschließend in 100µl-Ansätzen mit einer Konzentration von etwa 15 µmol/l in T7-Transcriptionen eingesetzt wurde. Der endgültige Nachweis der erfolgreichen Transcription wurde durch eine analytische Verdauung einer Teilmenge des Transcriptionsansatzes mit RNaseA bzw. mit DNaseI und der Trennung der verdauten Proben im direkten Vergleich zur unverdauten Ausgangsprobe in einer denaturierenden 10 % PAGE erbracht. Im Gel ist eine nahezu vollständige Verdauung der Probe durch RNaseA und kaum Veränderung durch die Behandlung mit DNaseI zu beobachten, was die erfolgreiche Umschreibung der Pool-DNA in RNA bestätigt.

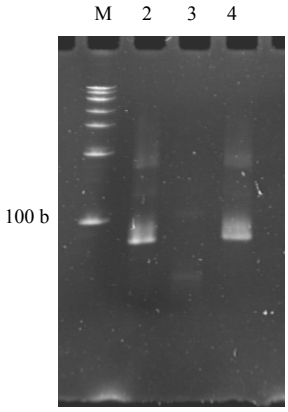

Bild 4-13: Analyse der verdauten Pool-RNA

Anhand einer denaturierenden 10 % PAGE konnten die analytisch verdauten Pool-Proben dargestellt werden; M: 2 µl RNA Low Range Ladder; 2: 5 µl Transcriptionsansatz des Pools, unverdaut; 3: 5 µl Transcriptionsansatz des Pools mit 0,5 µl RNaseA verdaut; 4: Transcriptionsansatz des Pools mit 0,5 µl DNaseI verdaut

Auf diese Weise konnte ein RNA-Pool mit einer Variabilität von ungefähr 1x 10^{15} Sequenzen in einer Konzentration von 0,2 mM hergestellt werden und stand dem eigentlichen Selektionsexperiment zur Verfügung.

4.3 Vorbereitung des RNA-Pools

Der hergestellte RNA-Pool stand nun in gereinigter und konzentrierter Form bereit. Um zu gewährleisten, dass die individuellen Sequenzen der Bibliothek in reproduzierbarer Faltung vorlagen, wurde der gesamte Pool zunächst bei 70 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 mM $MgCl_2$ und ein Rückfaltungsschritt bei 41 °C, für 30 Minuten. Diese Präparation der RNA-Probe wurde in allen folgenden Selektions- und Bindungsversuchen analog vorgenommen und bot dadurch eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichsmöglichkeiten.

4.4 Inkubation der Zielmoleküle mit der RNA-Bibliothek

4.4.1 Inkubation von RNA-Pool und Virus

1 µl Viruslösung und 3,5 µl der vorbereiteten Nucleotidbibliothek wurden miteinander für 30 Minuten bei 41 °C inkubiert. In diesem Schritt des Selektionsexperimentes lagerten sich RNA-Moleküle ihrer dreidimensionalen Struktur entsprechend an einzelne Viruspartikel an. Aufgrund der gewählten Puffer- und Temperaturbedingungen konnte man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass sich stabile Komplexe aus Virus und RNA bildeten, die mittels Kapillarelektrophorese von ungebundener RNA und freien Viruspartikeln abgetrennt werden konnten.

4.4.2 Inkubation von RNA-Pool und VP2

Analog zur Inkubation der RNA-Bibliothek mit dem Virus wurde der Ansatz für das rekombinante VP2 gewählt. Einziger Unterschied war die Konzentration an eingesetztem Protein. Da sich auf der Oberfläche eines nativen IBDV-Partikels 11.400 Kopien des VP2 befinden, wurde das exprimierte VP2 mit einer um diese Zahl erhöhten Konzentration verwendet. Der theoretische Separationsmechanismus von Virus, bzw. Protein und ungebundener RNA sollte identisch sein, weswegen alle folgenden Schritte für beide Zielmoleküle absolut deckungsgleich durchgeführt wurden.

4.5 Selektion mittels Kapillarelektrophorese

4.5.1 CE-SELEX für IBDV

Für die Selektion mittels Kapillarelektrophorese wurde eine mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare mit einer effektiven Länge von 40 cm zunächst mit DEPC-behandeltem Wasser und anschließend mit Selektionspuffer B gespült. Nachdem sichergestellt werden konnte, dass die

Kapillare frei von Verunreinigungen war, wurden die zu untersuchenden Moleküle einzeln chromatographisch mittels Detektion bei 200 nm überprüft. Zunächst musste die Reinheit und Darstellbarkeit der RNA-Bibliothek gewährleistet werden. Hierfür wurde der hergestellte Pool in einer Konzentration von 10 µM für 1 s hydrodynamisch injiziert und ein Separationslauf bei 15 kV und 30 °C durchgeführt.

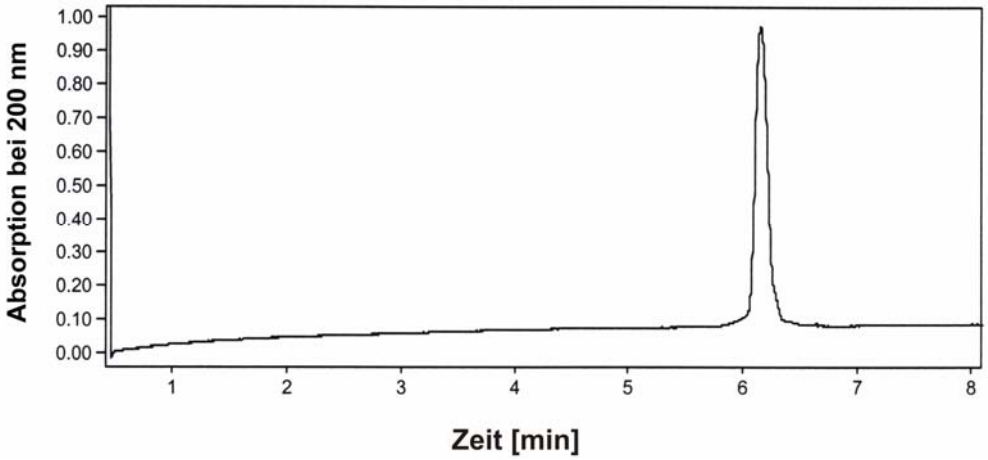

Bild 4-14: Chromatogramm des für die Selektion von RNA-Aptameren zu verwendenden RNA-Pools:

Hydrodynamische Injektion einer 10 µM Lösung über 1 s. Der Lauf erfolgte bei 30 °C und +15 kV in einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare von 40 cm Länge in Selektionspuffer B. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 200 nm

Da in einer ersten Selektion CsCl-gradientengereinigte IBDV-Partikel als Zielmoleküle verwendet werden sollten, mussten neben der RNA-Bibliothek auch diese Moleküle hinsichtlich ihrer Darstellbarkeit mittels CE überprüft werden. Dabei wurde analog zur RNA-Überprüfung vorgegangen.

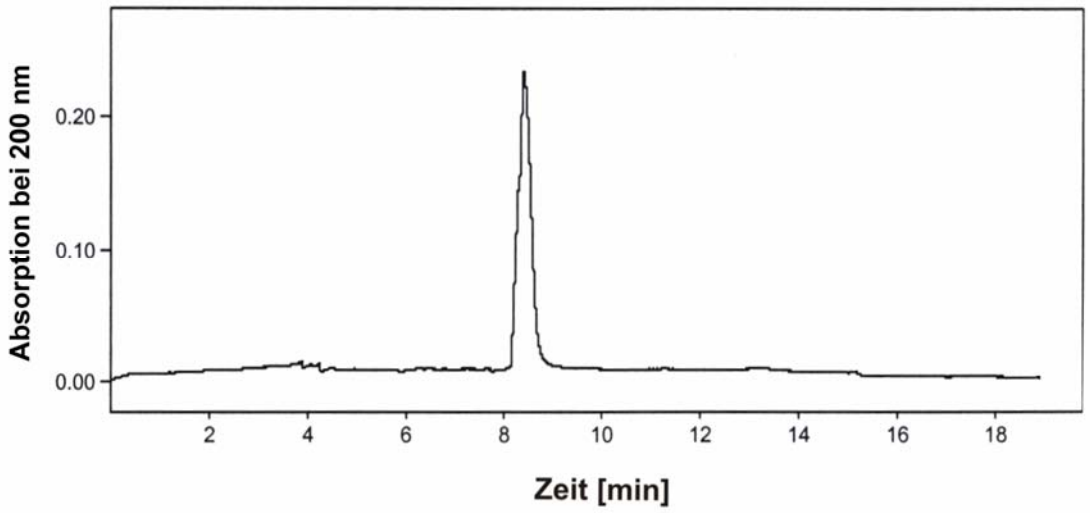

Bild 4-15: Chromatographische Darstellung des für die Selektion einzusetzenden Virus:

Hydrodynamische Injektion einer Viruslösung mit einer Konzentration von 10.000 Viruspartikeln in 50 nl über 4 s. Der Lauf erfolgte bei 30 °C und +15 kV in einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare von 40 cm Länge in Selektionspuffer B. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 200 nm

Beide beschriebenen Kapillarelektrophoresen bewiesen also, dass eine prinzipielle Detektion von den für die Selektion zu benutzenden Komponenten möglich war. Da die Chromatogramme von Pool und Target sich hinsichtlich ihrer Retentionszeit sehr stark ähnelten, mussten Laufbedingungen geschaffen werden, unter denen eine Trennung der einzelnen Selektionspartner erfolgen konnte. Diese Bedingungen wichen bezüglich der Polarität und der Probengewinnung von der allgemeinen Technik des CE-SELEX ab (Bild 4-16).

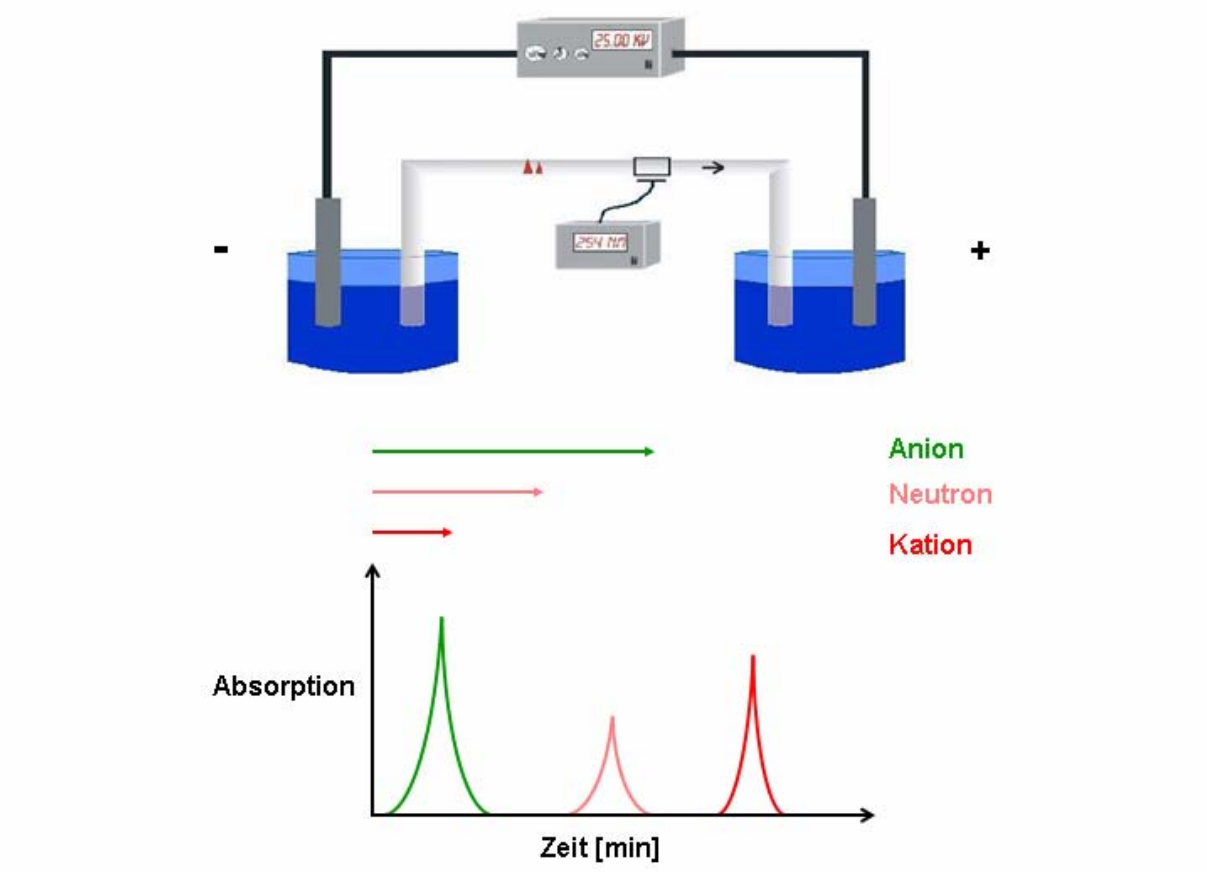

Bild 4-16: Spezieller Versuchsaufbau und Separationsmechanismus der CZE

Zwei Puffersysteme sind durch zwei Elektroden und eine Kapillare miteinander verbunden. Durch die Polyacrylamidbeschichtung kann der EOF ausgeschaltet werden (vgl. 1.2.1). In die Kapillare eingegebene Moleküle wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes abhängig von ihrem spezifischen Masse-Ladungs-Verhältnis weiterhin unterschiedlich. In dem hier gezeigten Versuchsaufbau wandern RNA-Moleküle schneller in Richtung Anode, während der Zielmolekül-RNA-Komplex langsamer wandert, bzw. in der Kapillare verbleibt

So erfolgte eine Umkehrung der Polarität, wobei die Kathode auf der Detektorseite und die Anode auf der Seite der Probeneingabe zu finden waren. Auf diese Weise änderte sich die Reihenfolge der zu trennenden Fraktion so, dass als schnellste und erste Probe ungebundene RNA den Detektor passierte. Nach dem Erfassen dieses Ereignisses konnte davon ausgegangen werden, dass sich der Komplex aus Zielmolekül und gebundener RNA aufgrund seiner verlangsamten Laufeigenschaften noch in der Kapillare befand.

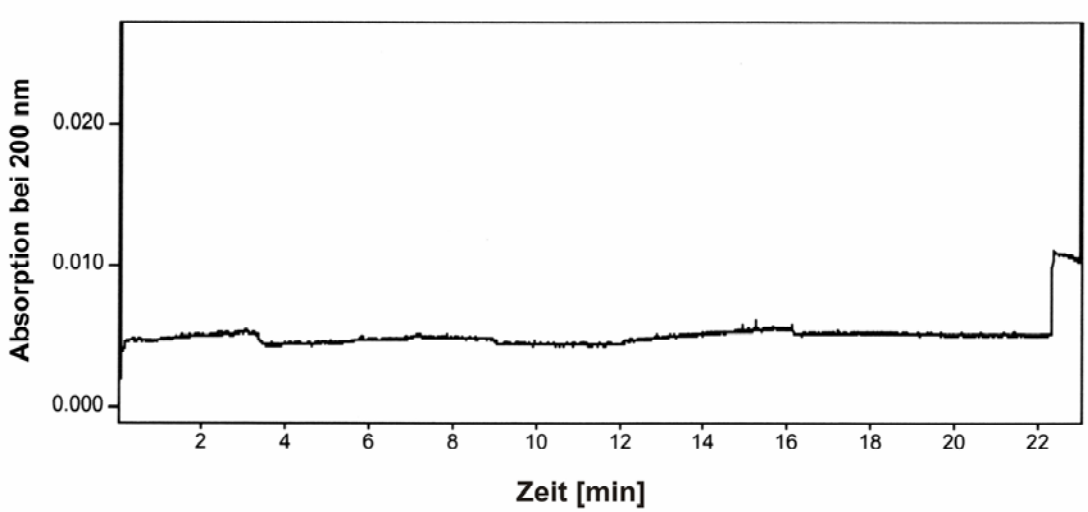

Bild 4-17: Illustration der ungebundenen RNA-Komponete:

Hydrodynamische Injektion der Virus-RNA-Lösung über 4 s. Der Lauf erfolgte bei 30 °C und -15 kV in einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare von 40 cm Länge in Selektionspuffer B. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 200 nm

In einem nächsten Schritt wurde das gesamte in der Kapillare verbliebene Volumen gewonnen und stand nun für weiterführende Analysen zur Verfügung.

Nach der beschriebenen ersten Selektionsrunde erfolgte eine Hybridisierungsreaktion, in der gebundene RNA-Sequenzen mit dem Primer Pool Rev hybridisierten. Dieses Konstrukt dient in der folgenden reversen Transcription (RT) der Umschreibung von RNA in DNA. Dazu wurde der gesamte Hybridisierungsansatz mit einem Volumen von 32 µl verwendet und in einem 50 µl Ansatz bei 42 °C für 1 h inkubiert. Die resultierende DNA konnte nun in einer PCR amplifiziert werden. Insgesamt wurden sechs 100 µl Ansätze benötigt, wobei in fünf Ansätzen je 10 µl der RT-Mixtur als Templat dienten. In einem weiteren Ansatz wurde an Stelle des DNA-Templats Wasser eingesetzt. Dieser Ansatz zur Kontrolle auf mögliche Kontaminationen. Während der PCR wurden nach je fünf Zyklen Aliquots entnommen, um die Effizienz der Amplifikation und eine eventuelle Verunreinigung durch Fremd-DNA zu überprüfen (Bild 4-18).

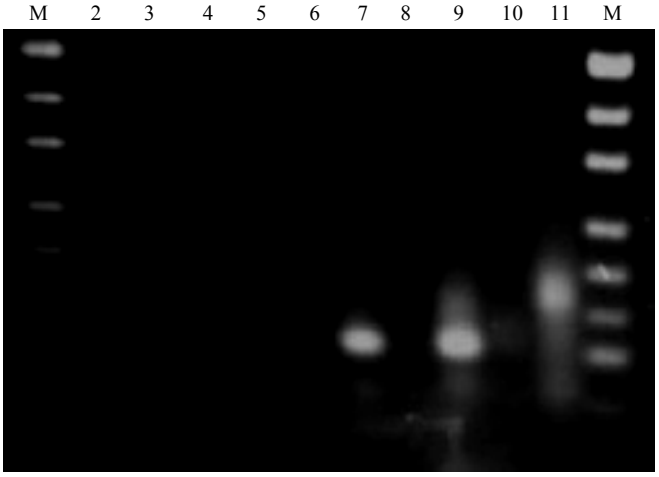

Bild 4-18: Analyse der Amplifikate der RT-PCR

Mittels einer analytischen Gelelektrophorese wurde die Amplifikation von DNA-Sequenzen, die den vorher an IBDV gebundenen RNA-Sequenzen entsprachen, analysiert. Dazu wurden je 10 µl eines PCR-Ansatzes und der Kontrolle nach jeweils 5 Zyklen entnommen und anschließend auf einem 2 % Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt; M: 4 µl pUC19/MspI; 2, 4, 6, 8, 10: je 10 µl Kontrollansatz nach 5, 10, 15, 20 und 25 Zyklen RT-PCR; 3, 5, 7, 9, 11: je 10 µl Probe nach 5, 10, 15, 20 und 25 Zyklen RT-PCR; Die erwartete Bande mit einer Größe von 109 bp konnte nach 15 Zyklen nachgewiesen werden, wohingegen in keiner Probe der Kontrolle ein Amplifikat zu sehen war

Durch Trennung der verschiedenen PCR-Aliquots konnten Amplifikate von richtiger Länge bereits nach 15 Zyklen nachgewiesen werden. Außerdem war auch nach der maximalen Zyklusanzahl keine Fremd-DNA in der Kontrolle amplifizert worden. Mit ansteigender Zykluszahl zeigte sich allerdings ein größeres Amplifikat als erwartet, was auf die Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Zyklusanzahl in den darauf folgenden Experimenten auf 20 festgelegt.

Die durch die vorangegangenen Versuche erhaltene DNA konnte in einer T7-Transcription wiederum in RNA umgeschrieben werden. Somit standen die in einer ersten Selektionsrunde isolierten Moleküle für den nächsten Selektionszyklus erneut zur Verfügung. Die Gesamtmenge der dsDNA wurde dabei so aufgeteilt, dass in jedem Transcriptionsansatz 15 µmol/l dsDNA vorlagen. Die erhaltene RNA wurde wiederum analytisch mit DNaseI und RNaseA verdaut und anhand eines denaturierenden 10 % Polyacrylamidgels überprüft. Bild 4-19 zeigt die erfolgreiche Verdauung der Probe durch RNaseA, sowie die richtige Größe der transcribierten RNA.

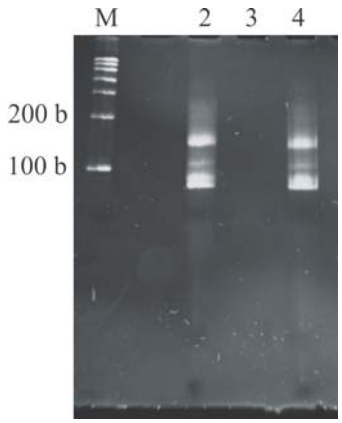

Bild 4-19: Analytische Verdauung des RNA-Pools für die zweite Runde CE-SELEX für Virus

10 % denaturierendes Polyacrylamidgel, gefärbt mit Ethidiumbromid; M: pUC19/MspI; 2: 5 µl T7-Transcriptionsansatz, unbehandelt; 3: 5 µl T7-Transcriptionsansatz, mit 0,5 µl RNaseA verdaut; 4: 5 µl T7-Transcriptionsansatz, mit 0,5 µl DNaseI verdaut

Die auf diese Weise hergestellte RNA konnte nun mittels DNaseI-Verdauung, präparative und denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese, Diffusionselution und Ethanolfällung weiter behandelt werden. Nach der Reinigung erfolgten eine Gefriertrocknung und die Einstellung des Pools der zweiten Selektionsrunde auf eine Konzentration von 2 mM. Im Vergleich dazu betrug die Konzentration des Ausgangspools aufgrund der aufwendigen Herstellungsverfahren nur 0,2 mM, wobei auch hier prinzipiell eine Konzentration von 2 mM angestrebt war. Analog zu dem oben beschriebenen Selektionsereignis fand nun mit dem frisch generierten RNA-Pool der zweiten Runde eine weitere Trennung zwischen ungebundenen Partitionen und dem RNA-Virus-Komplex statt. Nach erfolgreicher Separation und Gewinnung der gebundenen RNA erfolgte erneut eine Hybridiserung, reverse Transcription und PCR.

Um nähere Informationen über die Zusammensetzung des nach zwei Runden CE-SELEX erhaltenen Materials zu erhalten, wurde eine Klonierung von Teilmengen der in der PCR hergestellten Amplifikate vorgenommen. Um eine möglichst effiziente und schnelle Herstellung durchzuführen, wurde die Ligation der Amplifikate über einen A-Überhang, der immer durch PCR mit *Taq*-Polymerase entsteht, in den pGEM®-T Easy Vektor vorgenommen. Dieser Vektor besitzt an seinen 3'-Enden ein Thymidin, welches einen zum PCR-Produkt komplementären Überhang darstellt. 5 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α-Zellen transformiert. Das Ausstreichen von transformierten Zellen erfolgte auf LB-Platten, die zusätzlich Ampicillin, X-Gal und IPTG enthielten, um ein Blau-Weiss-Screening vorhandener Kolonien zu ermöglichen. Klone, die das gewünschte PCR-Produkt aufgenommen hatten, produzierten weiße Kolonien und konnten somit in einem ersten Schritt als wahrscheinlich positive Klone identifiziert werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten 30 Einzelkolonien gepickt und durch Ausstreichen auf frische LB-Platten inklusive Ampicillin vermehrt werden. Die Anzahl der gepickten Kolonien richtete sich nach deren

Handhabbarkeit, da auf den Platten um ein Vielfaches mehr weiße als blaue Kolonien vorhanden waren, und deshalb reichlich positive Klone vorhanden waren.
Durch Präparation der Klon-DNA mit dem TempliPhi™ DNA Amplification Kit konnten die einzelnen DNA-Proben für eine Sequenzierungsreaktion vorbereitet werden.

4.5.2 CE-SELEX für VP2

Für die Selektion von Aptameren für das rekombinant hergestellte VP2 wurde analog zum beschriebenen Selektionsmechanismus für IBDV vorgegangen. Zunächst musste die Unversehrtheit und Darstellbarkeit des RNA-Pools garantiert werden, wobei es sich um denselben Pool wie für die vorherige Selektion handelte (Bild 4-20).

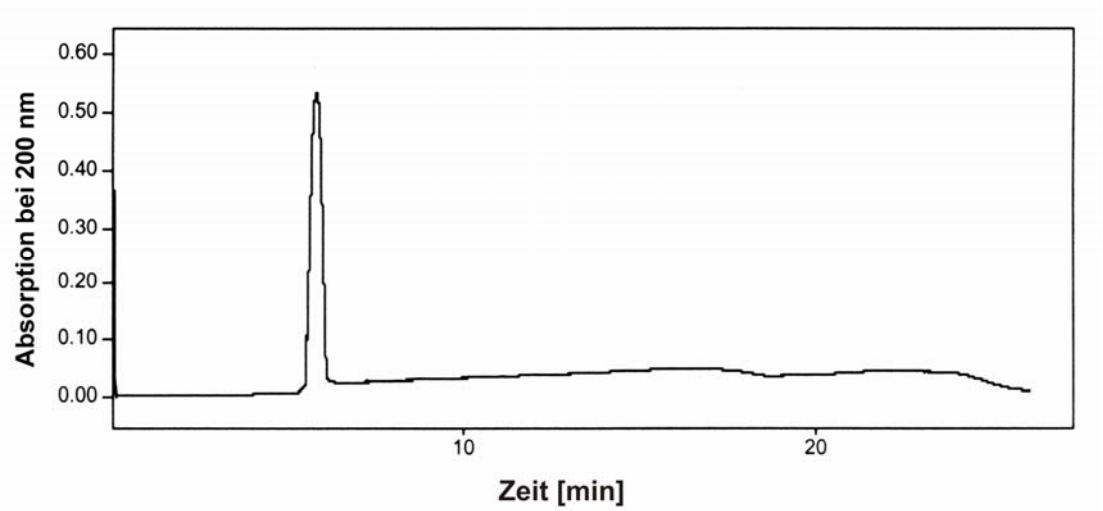

Bild 4-20: Chromatogramm des RNA-Pools für die Selektion von VP2-spezifischen Aptameren

Hydrodynamische Injektion einer 0,1 M Pool Lösung über 1 s. Der Probelauf erfolgte bei 30 °C und +15 kV in einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare von 40 cm Länge in Selektionspuffer B. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm detektiert

Neben dem RNA-Pool musste auch das Zielprotein mittels Kapillarelektrophorese visualisiert werden. Um ähnliche Bedingungen wie bei der Selektion der IBDV-Aptamere zu ermöglichen, wurde die gereinigte Proteinlösung nach der Affinitätschromatographie in Selektionspuffer A auf eine Konzentration von 1000 x 11.400 Molekülen/50 nl verdünnt. Diese Lösung wurde wiederum vor der eigentlichen Selektion in das Gerät eingegeben (Bild 4-21).

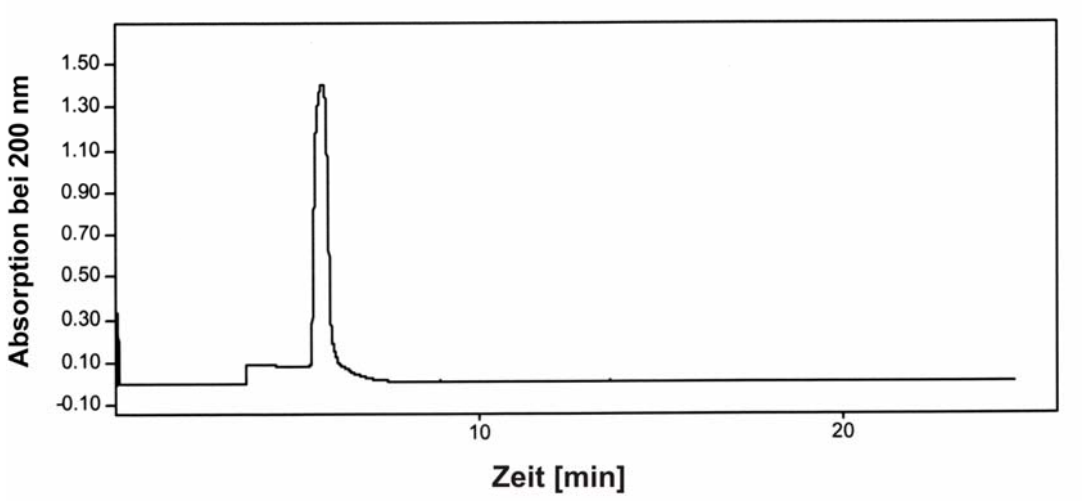

Bild 4-21: Darstellung des Zielproteins VP2

Mittels hydrodynamischer Applikation wurde die Proteinlösung über 1 s in die beschichtete Kapillare injiziert. Die Laufbedingungen von 30 °C Gerätetemperatur, +15 kV Spannung und 200 nm Wellenlänge für die Detektion wurden ähnlich den folgenden Selektionsanforderungen gewählt.

Vergleicht man die beiden Chromatogramme des RNA-Pools und der Proteinlösung miteinander, fällt auf, dass sich die Retentionszeiten beider Lösungen kaum merklich voneinander unterschieden lassen. Da die gewählten Versuchsbedingungen in den vorangegangenen Selektionsrunden für das Virus effektiv waren, wurden alle Parameter exakt übernommen. Bild 4-22 zeigt das Chromatogramm der RNA-VP2-Lösung, nach deren Trennung RNA-Protein-Komplexe aufgefangen wurden.

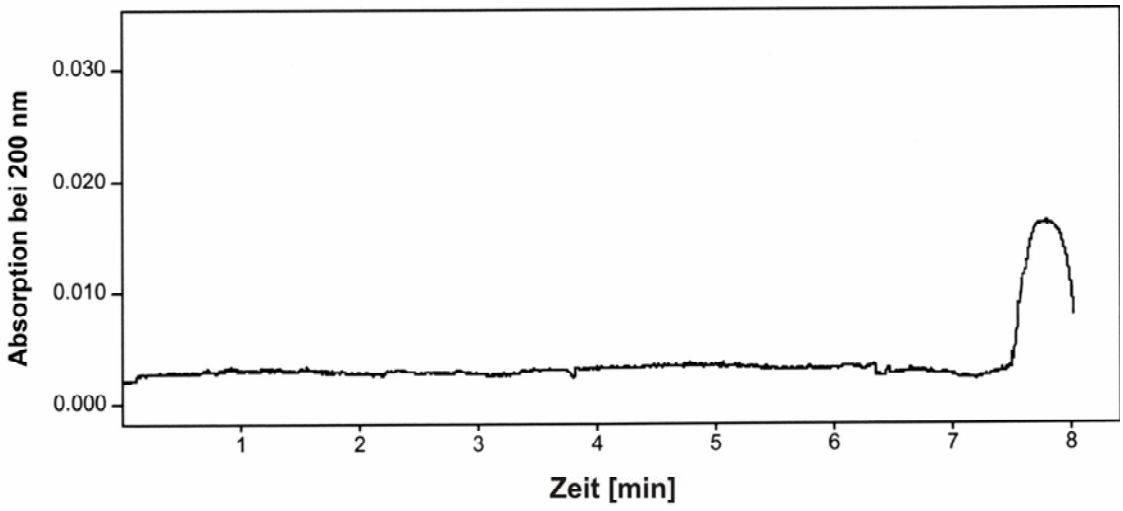

Bild 4-22: Chromatogramm ungebundener RNA-Moleküle während CE-SELEX für VP2

Über einen Zeitraum von 4 s wurde zuvor inkubierte RNA-Protein-Lösung in die mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare appliziert. Nach etwa 8 min Separation bei 30 °C und -15 kV war der Abfall eines prominenten Peaks zu erkennen.

Nach wiederholter Darstellbarkeit des oben gezeigten Peaks wurde der Lauf unterbrochen und das in der Kapillare verbliebene Volumen in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gespült, welches 32 µl mit DEPC behandeltes Wasser und 1 µl Primer Pool Rev enthielt. Im Anschluss daran erfolgte eine Hybridisierung und eine RT-PCR, wobei alle Schritte identisch zu den

vorangegangenen Experimenten bei der Selektion von Bindern für IBDV waren. Die erhaltene DNA von richtiger Größe (109 bp) wurde mittels *in vitro*-Transcription in RNA umgeschrieben und durch Probeverdauung durch RNaseA und DNaseI analysiert.
Nach Verdauung der restlichen DNA im Transcriptionsansatz durch DNaseI wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert (vgl. 3.2.8) und in Selektionspuffer A aufgenommen. Der nun für eine weitere Runde CE-SELEX fertig gestellte RNA-Pool wies eine Konzentration von 1 mM auf. Es erfolgte die Durchführung einer zweiten Selektionsabfolge, wobei, korrelierend mit der erhöhten Poolkonzentration, die VP2-Lösung um den Faktor 100 höher konzentriert als in der ersten Selektionsrunde gewählt wurde. Vorgehensweise vor und während der Selektion, Chromatogramme und weiterführende Experimente wurden analog zum ersten Zyklus durchgeführt. Nach RT-PCR wurden allerdings 3 µl des in cDNA umgeschriebenen Pools nach der zweiten Runde in den pGEM®-T Easy Vektor ligiert. Mit Hilfe der Elektroporation wurden nun kompetente *E. coli* (Top 10)-Zellen transformiert. 20 µl und 50 µl dieser Zellsuspension wurden im Anschluss an die Ausbildung der Antibiotikaresistenz der Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 30 weiße Kolonien ausgewählt und erneut auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen, um die DNA der Klone zu vermehren. Alle 30 Klone wurden am darauf folgenden Tag von Frau Elena Hensel mit dem TempliPhi™ Kit behandelt und der Sequenzierstelle übergeben. Von den 30 zurückerhaltenen Sequenzen waren alle gut lesbar und wurden mittels der Software mfold analysiert.

4.6 Charakterisierung selektierter Aptamere

4.6.1 Charakterisierung der virusbindenden RNA-Moleküle

Eine Sequenzierung der 30 willkürlich ausgewählten Klone resultierte in gut lesbaren Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 400 Basenpaaren. Über einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Sequenzen konnte festgestellt werden, dass 25 Sequenzen absolut identisch waren. Ihre Gesamtlänge betrug auf Ebene der RNA-Sequenz lediglich 61 b und beinhaltete in allen Fällen die vollständigen Primerbindungsstellen, sowie dieselben elf Nucleotide im randomisierten Bereich (Bild 4-23).

A 5' –TCTAATACGACTCACTATAGGGAATTCAGAAGAATAGAATAG– TGAGTCGTATT –AGAGAGAGGGTGAAACTGCAGAGGCTG– 3'

B 5' –GGGAAUUCAGAAGAAUAGAAUAG– UGAGUCGUAUU –AGAGAGAGGGUGAAACUGCAGAGGCUG– 3'

Bild 4-23: DNA- und RNA-Sequenz der erhaltenen 61-mere

A: vollständige Sequenz der 25 identischen 61-mere auf DNA-Ebene, der Rahmen markiert die elf randomisierten Nucleotide. B: RNA-Sequenz der 61-mere

Eine eingehende Analyse des randomisierten Bezirkes zeigte eine Übereinstimmung der elf Nucleotide mit dem T7-Promotor, wie er im Primer Pool Fw enthalten war. Eine Begründung für dieses Phänomen kann sein, dass in der RT-PCR so genannte Primer-Dimere amplifiziert wurden. Um diese Problematik zu umgehen, kann man Primer mit höheren Schmelztemperaturen generieren. In diesem Fall waren jedoch neben den verkürzten auch fünf Sequenzen von der erwarteten Länge von 90 b zu verifizieren. Bild 4-24 zeigt die PCR-Amplifikate der verkürzten, dominanten Sequenz (Sequenz 61) und die der fünf ausgewählten Sequenzen von erwarteter Größe.

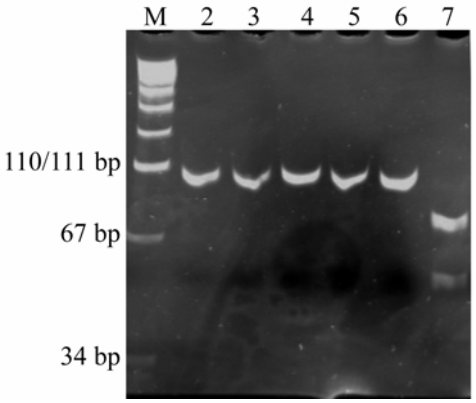

Bild 4-24: DNA der sechs ausgewählten Klone nach 2 Runden CE-SELEX für Virus

10 % natives Polyacrylamidgel, Färbung mit Ethidiumbromid; aufgetragen waren je 5 µl PCR-Produkt; M: pUC19/MspI; 2: Sequenz 90-4; 3: Sequenz 90-8; 4: Sequenz 90-18; 5: Sequenz 90-19; 6: Sequenz 90-26; 7: Sequenz 61

Diese fünf Sequenzen (bezeichnet mit 90-4, 90-8, 90-18, 90-19 und 90-26) besaßen ebenfalls die beiden kompletten Primerbindungsstellen, zusätzlich jedoch je 40 unterschiedliche Nucleotide (Bild 4-25.

90-4: 5' - Primer Pool Fw -CGGTATGCGGCTGTGGGATGGCTGGGCTCATGCAAGTTTT- Primer Pool Rev - 3'

90-8: 5' - Primer Pool Fw -GGATACGGAGGGTGACGCCGCTGTCAGCTTGATGGTAGGC- Primer Pool Rev - 3'

90-18: 5' - Primer Pool Fw -GGTCTCTAGGGGATTTTCTCGCGGGTTCCGGTAAGTAGGC- Primer Pool Rev - 3'

90-19: 5' - Primer Pool Fw -GTGCTCTGTCCTTCTGATTTGGTCGTGTGTTGGATGGCGG- Primer Pool Rev - 3'

90-26: 5' - Primer Pool Fw -TGGCCGCGTCTGGGCTTGTGATCTCGTTAGGCAGTAGGCC- Primer Pool Rev - 3'

Bild 4-25: Randomisierte Bereiche der fünf 90-mere nach zwei Runden CE-SELEX für Virus

Innerhalb dieser Sequenzen konnten keine signifikanten Ähnlichkeiten festgestellt werden. Die Plasmid-DNA der beschriebenen fünf 90-mere wurde nun in Übernachtkulturen vermehrt und gereinigt, um genügend Ausgangsmaterial für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Ziel war es, die bekannten Sequenzen in ausreichenden Mengen auf RNA-Ebene herzustellen und zu reinigen. Mit diesen RNA-Molekülen sollten dann Bindungsstudien mit ihrem vermeintlichen Target und Vergleichsmolekülen durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst durch eine PCR die gereinigte Plasmid-DNA vermehrt. Prinzipiell sollte eine PCR nicht unbedingt notwendig sein, um genügend DNA für eine anschließende T7-Transcription zur Verfügung zu haben. In dieser Arbeit befanden sich die DNA-Moleküle jedoch in einem Vektor, der ebenso wie die zu analysierenden Nucleotide, einen T7-Promotor besaß. Somit ergab sich bei einer Transcription in RNA immer auch ein gewisser Anteil von nicht erwünschter DNA, die aus dem Vektor stammte. Um den Anteil der eigentlich gewünschten RNA zu erhöhen, wurde also von vornherein die Menge der Ausgangs-DNA mittels PCR erhöht. Eine Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation erfolgte über eine native 10 % PAGE und anschließende Färbung mit Ethidiumbromid (Bild 4-26).

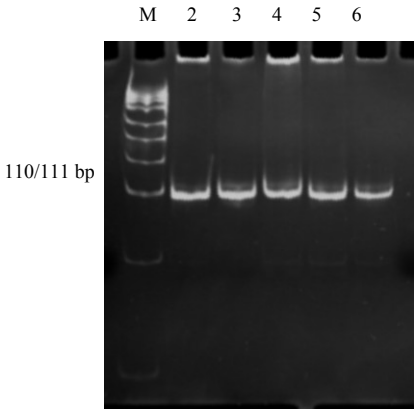

Bild 4-26: Amplifikate der fünf selektierten 90-mere nach PCR

Mittels einer analytischen Gelelektrophorese wurden die Amplifikate der den selektierten RNA-Molekülen entsprechenden DNA-Sequenzen analysiert. Dazu wurden jeweils ca. 5 µl DNA auf einem 10 % Polyacrylamidgel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt; M: pUC19/MspI; 2: 90-4; 3: 90-8; 4: 90-18; 5: 90-19; 6: 90-26

Sekundärstrukturvorhersagen

Eine Form der Analyse der erhaltenen Nucleotidsequenzen ist die Berechnung ihrer Sekundärstrukturen, basierend auf der Zuordnung von Energiewerten zu den einzelnen Strukturelementen. Berücksichtigt werden hier stabilisierende oder destabilisierende Einflüsse diverser Loops und Stapelungsinteraktionen der Basen mit ihren nächsten Nachbarn und die verschiedenen möglichen Basenpaarungen (G:C, A:U, G:U). Um eventuelle strukturelle Ähnlichkeiten und eine erste Aussage über die Stabilität der fünf 90-mere zu erhalten, wurde das Programm mfold 2.3 verwendet. In dieser Version der frei verfügbaren Software kann man die Faltungstemperatur frei wählen und sie, wie in diesem speziellen Fall, entsprechend den Selektionsbedingungen auf 41 °C einstellen. Die Softwareanalyse ergab eine unterschiedliche Anzahl von möglichen Sekundärstrukturen der einzelnen Moleküle und deutlich voneinander abweichende ΔG-Werte, die das Maß der freien Enthalpie und somit die Stabilität der einzelnen 90-mere bezeichnet (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: berechnete ΔG-Werte der selektierten 90-mere

RNA-Bezeichnung	Anzahl der berechneten Sekundärstrukturen	Berechnete ΔG-Werte [kcal/mol]
90-4	3	-18,3 bis -18,8
90-8	3	-14,0 bis -14,8
90-18	6	-14,8 bis -15,7
90-19	5	-15,4 bis -16,2
90-26	1	-19,7

Alle für die oben aufgeführten Moleküle berechneten Sekundärstrukturen schienen sich strukturell relativ stark zu ähneln. Bild 4-27 zeigt die laut mfold mögliche Sekundärstruktur, die das Molekül 90-26 einnehmen kann. Auffällig war hier bereits, dass der größte Teil der theoretischen Sekundärstruktur von den nicht randomisierten Primerbindungsstellen vorgegeben war (Bild 4-27 B). Man könnte also postulieren, dass man die möglichen Konformationen der in einem Pool vorhandenen Moleküle bereits durch die vorgegebenen Primerbindungsstellen in gewisser Weise beeinflusst. Bisher sind allerdings noch keine Nucleotidsequenzen für diese Regionen empfohlen worden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Beeinflussung durch Vorgabe der Primerbindungsstellen nicht dazu führt, dass alle in einem Pool potentiell hoch spezifisch bindenden Moleküle dadurch ihre Konformation ändern und so als Aptamere nicht mehr zu identifizieren wären.

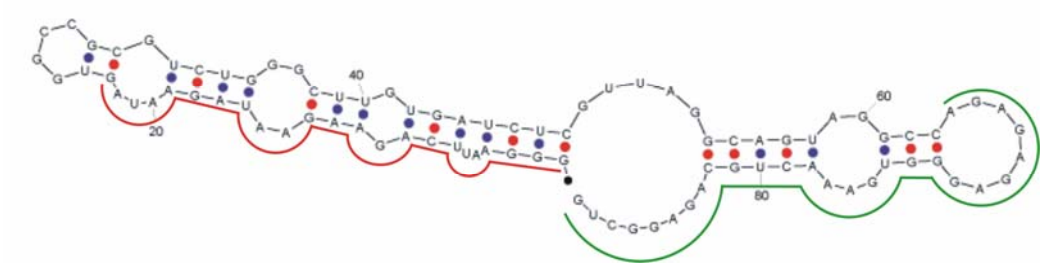

Bild 4-27: Mögliche Sekundärstruktur des Moleküls 90-26

Mit Hilfe der Software mfold wurde für das nach zwei Runden CE-SELEX für IBDV erhaltene Molekül 90-26 eine mögliche Sekundärstruktur berechnet; Kennzeichnung der beiden Primerbindungsstellen im RNA-Molekül (Primer Pool Fw und Primer Pool Rev)

4.6.2 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach CE-SELEX für Virus

Aufbau des Filterbindungstests

Da es sich bei den fünf vorhandenen Sequenzen um eine überschaubare Anzahl von Molekülen handelte, wurden alle hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit in radioaktiven Filterbindungstests (FBT) untersucht (Markierung vgl. 3.8.2). Das Prinzip, das dem hier eingesetzten FBT zugrunde liegt, ist die Fähigkeit von Proteinen und Viren, unabhängig von ihrer Größe unspezifisch an die kommerziell erhältliche Membran zu binden. Falls in einem vorgeschalteten Selektionsprozess bindende Moleküle identifiziert werden konnten, werden diese durch ihre Bindung an das Zielmolekül an dem Filter zurückgehalten. Wenn in diesem Versuchsaufbau hinsichtlich ihrer Affinität schlecht bindende Moleküle eingesetzt werden, sollten sie den Filter passieren und eluiert werden. Durch radioaktive Markierung der einzusetzenden RNA kann deren Bindung an das Zielmolekül und somit ihr Verbleiben auf dem Filter, bzw. ihre Passage verfolgt werden (Bild 4-28).

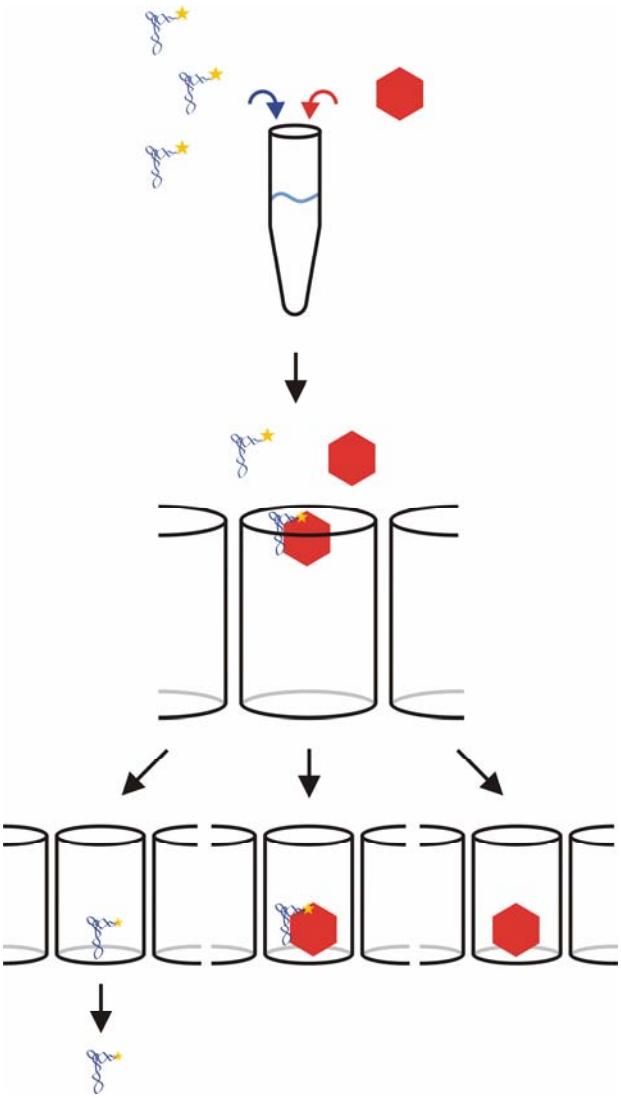

Bild 4-28: Schematische Darstellung des Filterbindungstests

A: Viruspartikel und radioaktiv markierte RNA-Moleküle werden miteinander in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 4,5 µl bei 41 °C für 30 min inkubiert, um eine Anlagerung von RNA an Viruspartikel zu ermöglichen; B: Die RNA-Virus-Lösung wird auf den Filter pipettiert; C: Nicht gebundene RNA-Moleküle werden durch Zentrifugation durch den Filter gespült und erhöhen den cpm-Wert (*counts per minute*) der jeweiligen Waschfraktion; bindende RNA wird durch das an den Filter gebundene Virus in der Vertiefung der Filterplatte zurückgehalten, was zu einem niedrigeren cpm-Wert in der jeweiligen Waschfraktion führt

Nach dem Auftragen der Probe auf den Filter und nach zwei Waschvorgängen der Membran kann die erhaltene Waschfraktion in einem Szintillationszähler vermessen werden. Das erhaltene Signal wird in *counts per minute* (cpm) erfasst. In diesem konkreten Fall enthält die Waschfraktion einer Probe, die Virus und dafür selektiertes Aptamer enthält, einen niedrigeren cpm-Wert als eine Fraktion, in der nur Aptamer enthalten ist.

In einer ersten Versuchsrunde wurden die fünf näher charakterisierten Sequenzen, die nach zwei Runden CE-SELEX für IBDV-Partikel erhalten worden waren, auf ihre Bindung an das Virus untersucht. Vor dem eigentlichen FBT mussten die Sequenzen zunächst durch PCR angereichert und anschließend durch *in vitro*-Transcription in RNA umgeschrieben werden. Nach intensiver Reinigung wurden je 20 pmol aller fünf Sequenzen dephosphoryliert, um im

Anschluss durch die T4-Polynucleotidkinase an ihrem jeweiligen 5'-Ende mit [γ-^{32}P]-ATP markiert zu werden. Durch die Reinigung der markierten RNA mit Hilfe von Micro Bio Spin Columns (BioRad, München, D) konnte überschüssiges [γ-^{32}P]-ATP entfernt werden.

Filterbindungstest mit fünf ausgewählten Sequenzen und Virus

Für den eigentlichen FBT wurde das vorangegangene Selektionsexperiment (vgl. 4.5.1) zunächst simuliert. Die einzusetzende RNA mit einer Konzentration von 190 nM wurde für 10 min bei 70°C denaturiert unter Zugabe von 1 mM MgCl2 für 30 min bei 41 °C renaturiert und mit Viruslösung ebenfalls für 30 min bei 41 °C inkubiert. In der Zwischenzeit äquilibierte man die Filterplatte mit je 250 µl Selektionspuffer B pro Vertiefung. Da das Volumen einer einzelnen Probe lediglich 4,5 µl betrug, wurde es mit Selektionspuffer B auf insgesamt 50 µl erhöht und war dadurch einfacher zu handhaben. Durch zügiges Pipettieren aller zu untersuchenden Proben mit einer Mehrkanalpipette konnte dieselbe Verweildauer aller Proben auf den Membranen gewährleistet werden. Nach sofortiger Zentrifugation von 2 min bei 4.000 g wurden pro Vertiefung je 250 µl Selektionspuffer B eingefüllt und durch wiederholte Zentrifugation mit den zuvor gewonnenen Waschfraktionen vereinigt. Das Endvolumen einer Probe betrug nun 300 µl und wurde in einem Reaktionsgefäße für Szintillationszähler mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und anschließend vermessen. Als Kontrollen wurden die eingesetzten RNA-Moleküle ohne Virus inkubiert und auf die Filter aufgetragen und auch sofort im Szintillationszähler vermessen. Außerdem diente eine zusätzliche Probe (5S rRNA aus *E. coli*) als Vergleich, da von dieser Probe angenommen werden konnte, dass sie keine bzw. unspezifische Bindung zum Zielmolekül aufweist. Da man die cpm-Werte der unbehandelten, vermessenen RNA-Proben als 100 %-Werte berechnete, konnte man den prozentualen Anteil an radioaktiven Molekülen in den Waschfraktionen berechnen (Bild 4-29).

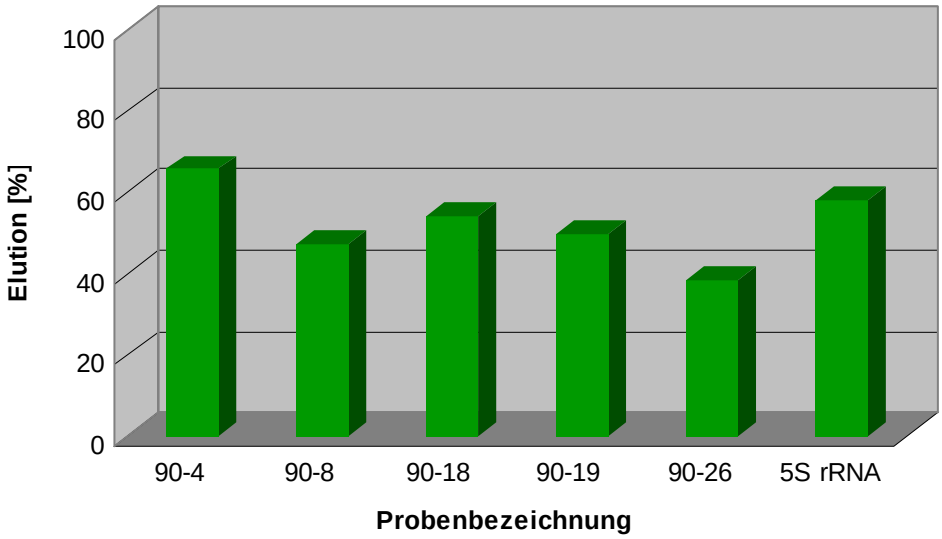

Bild 4-29: Darstellung der prozentualen Anteile der radioaktiven Moleküle in den jeweiligen Waschfraktionen

In einer Dreifachbestimmung des beschriebenen Versuches konnte festgestellt werden, dass von den fünf vermeintlichen Bindern vier einen niedrigeren cpm-Wert in ihrer jeweiligen Waschfraktion aufweisen als die Kontroll-RNA. Durch Umkehr aller Werte konnte die prozentuale Bindung derselben Moleküle berechnet und grafisch dargestellt werden (Bild 4-30).

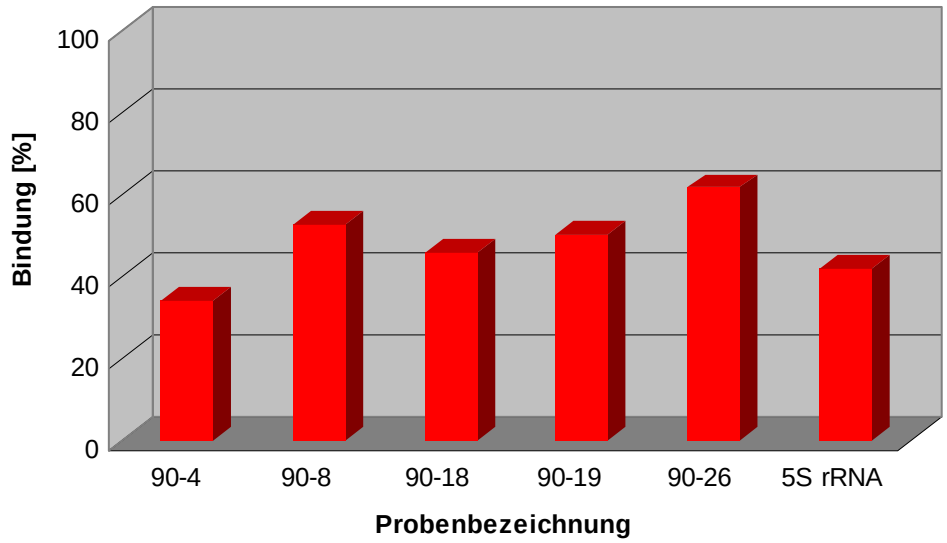

Bild 4-30: Darstellung der prozentualen Anteile der radioaktiven Moleküle in den jeweiligen gebundenen Fraktionen

Anhand dieser Darstellung konnte ermittelt werden, dass vier der fünf ausgewählten Sequenzen 4 % (90-18) bis 20 % (90-26) besser als das Kontrollmolekül binden. RNA 90-26 hatte bereits in der Sekundärstrukturanalyse den niedrigsten ΔG-Wert und nur eine theoretisch mögliche Sekundärstruktur ergeben. Die im FBT ermittelte höchste prozentuale Bindung bestätigte diese Angaben, weswegen diese Sequenz in weiteren Bindungsexperimenten untersucht wurde.

Filterbindungstest von Sequenz 90-26

Um die Spezifität des RNA-Moleküls 90-26 genauer zu untersuchen, wurde ein weiterer FBT in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Als Zielmoleküle für eine mögliche Bindung dienten dabei BSA und M13-Phagen. BSA ist bekannt dafür, von selektierten Molekülen unspezifisch erkannt zu werden und sollte deshalb als Kontrollmolekül eingesetzt werden. Bei den filamentösen M13-Phagen handelt es sich um eine weitere Gegenprobe, wobei dieses Molekül dem eigentlichen Zielobjekt strukturell näher steht.

Die Durchführung dieser drei FBT war analog zu den oben beschriebenen. Lediglich in der Konzentration der Zielmoleküle traten Unterschiede auf. Die jeweilige Stammlösung beider Moleküle wurde auf 2,8 x 10^{-15} mol in 4,5 µl eingestellt. Dieses Volumen war mit dem der eigentlichen Selektion und dem des vorangegangenen Experimentes identisch. Eine 1:2-Verdünnung der BSA- und M13-Stammlösung in Selektionspuffer B wurde vorbereitet, zu der nach Abschluss der vorbereitenden Versuche zur RNA-Faltung jeweils die gleiche Konzentration an RNA (190 nM) zugesetzt wurde. Als Kontrolle für das Zielmolekül wurden zudem identische Virusverdünnungen und für die RNA 5S rRNA eingesetzt. Identisch zu dem beschriebenen FBT wurden diese einzelnen Waschfraktionen gewonnen und analysiert. Zur vereinfachten Darstellung zeigt Bild 4-31 zunächst die prozentualen Anteile der vorher mit Virus und BSA inkubierten und auf dem Filter verbliebenen Fraktionen, wobei RNA 90-26 und die 5S rRNA sich gegenübergestellt wurden.

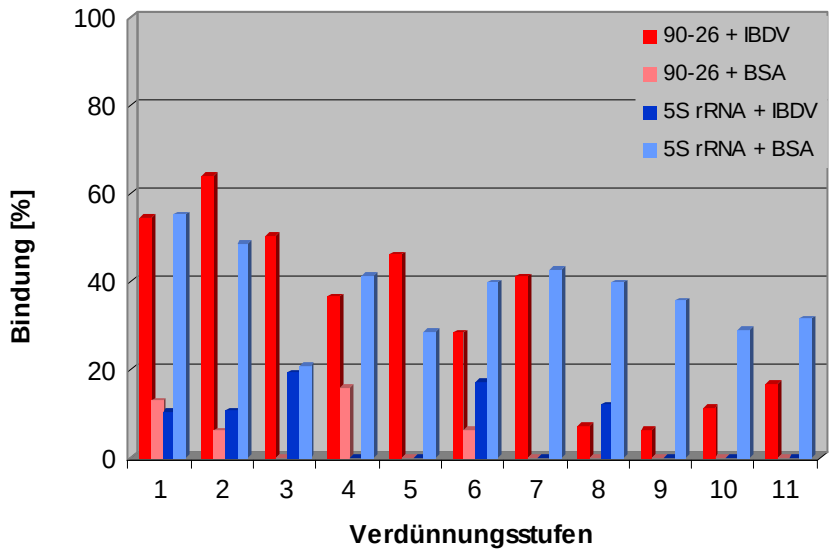

Bild 4-31: Darstellung der prozentualen Anteile der radioaktiven Moleküle in den jeweiligen gebundenen Fraktionen

Die selektierte Sequenz 90-26 und die Kontroll-RNA 5S rRNA wurden dabei jeweils mit IBDV, bzw. mit BSA in unterschiedlichen Verdünnungen inkubiert

In allen elf Verdünnungsstufen war die Bindung des selektierten RNA-Moleküls an das Virus signifikant höher als an BSA. Umgekehrt wies die Gegenprobe mit 5S rRNA in allen Verdünnungen eine bessere Bindung an BSA als an das Virus auf. Es konnte soweit eine spezifische Bindung der Sequenz 90-26 an das gewünschte Zielmolekül nachgewiesen

werden. Bild 4-32 zeigt die Resultate aus dem nachfolgenden Test mit M13-Phagen als möglichem Bindungspartner.

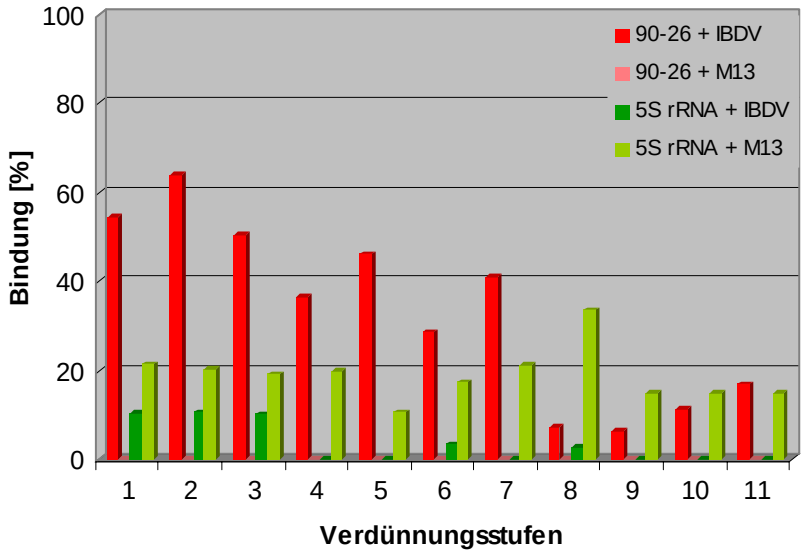

Bild 4-32: Darstellung der prozentualen Anteile der radioaktiven Moleküle in den jeweiligen gebundenen Fraktionen

RNA 90-26 und 5S rRNA wurden bei dem gezeigten Experiment mit IBDV-Partikeln, bzw. M13-Phagen in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert

Analog zu den bisherigen Ergebnissen konnte auch in diesem FBT eine spezifische Bindung des selektierten RNA-Moleküls an IBDV unterstrichen werden. Im Gegensatz dazu war wieder eine bessere Bindung der Kontroll-RNA an die M13-Phagen zu beobachten. Im direkten Vergleich der beiden letzten Experimente fiel auf, dass die selektierte Sequenz eindeutig schwächer an die Kontrollmoleküle als an das Virus bindet. Es konnte zusätzlich in Versuchswiederholungen keinerlei Bindung des RNA-Moleküls an M13-Phagen nachgewiesen werden. Die in beiden Versuchen bessere Bindung der Kontroll-RNA unterstrich die unspezifische Bindung von willkürlich ausgewählten RNA-Molekülen an verschiedene Targets, wohingegen das selektierte Aptamer in seiner Affinität zu dem zugehörigen Zielmolekül deutlich charakterisiert wurde.

Ermittlung der Dissoziationskonstante K_d des 90-26/IBDV-Komplexes

Ein besonderes Merkmal für Aptamere, gebunden an ihr Zielmolekül, ist ihre Dissoziationskonstante. Für die Berechnung dieser Konstante wurden unterschiedliche Viruskonzentrationen mit der gleichen Konzentration an RNA 90-26 inkubiert. Ebenso wurde mit der 5S rRNA als Gegenprobe verfahren, der K_d-Wert wurde hierbei allerdings nicht bestimmt, da in vorhergehenden Bindungsstudien bereits keine spezifische Bindung nachgewiesen werden konnte. Der gesamte Versuchsablauf war absolut identisch mit den beschriebenen Bindungstests. Über die beiden bekannten Konzentrationen konnte anhand der ermittelten cpm-Werte der K_d-Wert errechnet werden, wofür die Software *Origin® 6.1* verwendet wurde. Bei der Berechnung wurde eine Kurve, die dem Verlauf einer Bindung nach dem so genannten *one site binding*-Modell entspricht, an die Datenpunkte angeglichen.

Aus den kurvenspezifischen Variablen konnte die Software die Dissoziationskonstante und die Sättigungskonzentration berechnen. Die hierbei zur Berechnung der beiden Konstanten verwendete Formel lautete:

$$y = \frac{B_{max} \times x}{K_d + x}$$

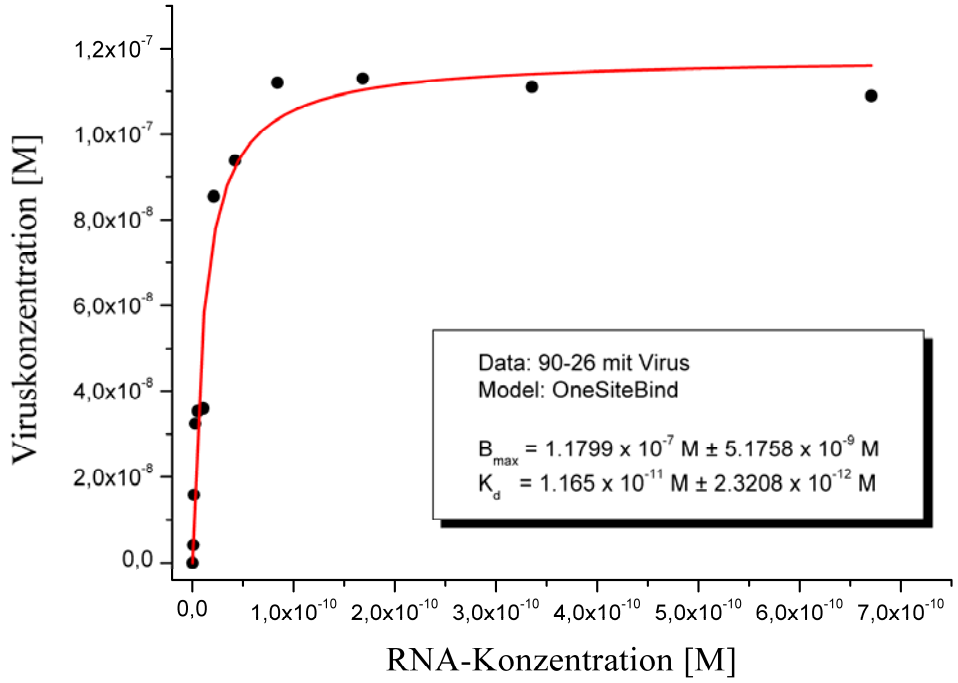

Bild 4-33: Bindungskurve, B_{max} und K_d für Molekül 9-26

Mit Hilfe der Software *Origin® 6.1* konnten die oben genannten Werte ermittelt werden, wobei die Viruskonzentration als Target auf der y-Achse, und die RNA-Lösung als Ligand auf der x-Achse dargestellt sind

Wie in dem obigen Bild 4-33 dargestellt, konnte die Dissoziationskonstante für das Aptamer 90-26 mit 1,165 x 10^{-11} berechnet werden. Dieser Wert gilt für das selektierte Molekül und den gesamten Viruspartikel. Wenn man nun bedenkt, dass sich auf der Oberfläche eines einzelnen Virusmoleküls 11.400 Kopien des VP2 befinden (vgl. 1.1.2), sollte der erhaltene Wert um diesen Faktor bereinigt werden. In diesem Fall ergibt sich ein Wert von 132,81 x 10^{-9} M für das Aptamer 90-26.

4.6.3 Charakterisierung der VP2-bindenden Moleküle nach zwei Runden CE-SELEX

Aufgrund der Tatsache, dass - im Gegensatz zu den nach zwei Runden CE-SELEX für IBDV erhaltenen Sequenzen - alle 30 sequenzierten Klone die ursprüngliche Länge von 90 b besaßen, musste eine Auswahl einer zu bearbeitenden Anzahl von Molekülen getroffen werden. Da in den FBT mit den virusbindenden Strukturen fünf Sequenzen gut gehandhabt werden konnten, sollten nun aus den 30 erhaltenen Sequenzen fünf ausgewählt werden. Als

Maß für Stabilität wurde ein besonders niedriger ΔG-Wert erachtet, weswegen für die Berechnung dieses Wertes alle Sequenzen mit mfold untersucht wurden.

Sekundärstrukturvorhersagen

Einziger von den Vorgaben der Software abweichender Parameter war die Faltungstemperatur, die, entsprechend den realen Selektionsbedingungen, auf 41 °C angehoben wurde. Die fünf Moleküle mit den niedrigsten ΔG-Werten (Tabelle 4-2) waren für Filterbindungsanalysen interessant. Neben den fünf aufgelisteten Molekülen waren die restlichen 25 ebenfalls gut analysierbar, besaßen allerdings deutlich höhere Werte für ihre freie Enthalpie, die im Bereich von -13, bis -16,8 [kcal/mol] lagen.

Tabelle 4-2: Berechnete ΔG-Werte der selektierten 90-mere nach zwei Runden CE-SELEX für VP2

RNA-Bezeichnung	Anzahl der berechneten Sekundärstrukturen	Berechnete ΔG-Werte [kcal/mol]
2-1	1	-19,9
2-2	5	-18,0 bis -18,6
2-4	2	-27,2 bis -27,7
2-9	3	-17,4 bis -18,4
2-23	2	-18,8 bis -19,4

Auffällig war die hohe Anzahl an möglichen Sekundärstrukturen aller 30 Klone. Auch die wegen ihres niedrigen ΔG-Wertes interessante Sequenz 2-4 wies zwei mögliche Strukturen auf, wohingegen die Software für das Molekül mit dem niedrigsten ΔG-Wert nach zwei Runden CE-SELEX für Virus nur eine mögliche Struktur ergab (vgl. Tabelle 4-1). Eine Analyse des randomisierten Bereichs der fünf weiter zu betrachtenden RNA-Moleküle ließ keine signifikanten Zusammenhänge untereinander, sowie zu den Sequenzen der virusbindenden Moleküle erkennen (Bild 4-34). Es konnte lediglich eine Ähnlichkeit von 30 % festgestellt werden.

```
2-1:   5' - Primer Pool Fw - CTCAGCTGTCGTTGTCCTCTCCAACTGCGTGCGGGCTTTG - Primer Pool Rev - 3'
2-2:   5' - Primer Pool Fw - TTGGGGTCTGCGGTGGGCCTTGCTCCGATTGGTGTGGCAA - Primer Pool Rev - 3'
2-4:   5' - Primer Pool Fw - GCTTCTGCTTGTCGTGCCTTTTTGGGCTAGGGTTGGGGTT - Primer Pool Rev - 3'
2-9:   5' - Primer Pool Fw - GTGCGCTCACGTTCGGGCGGCGTTCTGCGTGGAATCCCAC - Primer Pool Rev - 3'
2-23:  5' - Primer Pool Fw - GCTTGTGCTTGTCGTGCCTTTTTGGGGTAGGGTTGGGGTT - Primer Pool Rev - 3'
```

Bild 4-34: Darstellung der randomisierten Bereiche fünf ausgewählter Sequenzen nach zwei Runden CE-SELEX für VP2

Neben den theoretischen Analysen sollten die fünf ausgewählten Moleküle auch praktisch hinsichtlich ihrer Bindung untersuch werden, weswegen die Darstellung aller zu analysierenden RNA-Moleküle in konzentrierter und reiner Form notwendig war. Mittels PCR wurde die DNA dieser fünf Klone vermehrt und danach in RNA transcribiert. Bild 4-35

zeigt beispielhaft für alle fünf aufgeführten Strukturen ein analytisches Gel zur Überprüfung der erfolgreichen Umschreibung, Konzentrationserhöhung und Reinigung für nachfolgende Untersuchungen.

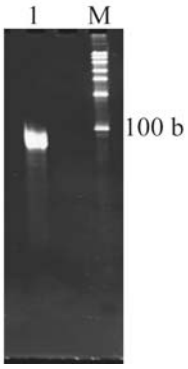

Bild 4-35: Kontrolle der Effizienz von *in vitro*-Transcription, Reinigung und Ethanolpräzipitation einzelner selektierter RNA-Moleküle

10 % denaturierendes Polyacrylamidgel, im Anschluss an den gelelektrophoretischen Lauf mit Ethidiumbromid gefärbt; M: 2 µl RNA Low Range Ladder; 1: 0,5 µl Sequenz 2-4

Alle fünf selektierten Sequenzen, sowie die Kontrolle 5S rRNA wurden wie unter 3.2.4 beschrieben behandelt und zum Abschluss gelelektrophoretisch analysiert.

Neben der Ermittlung der ΔG-Werte waren auch die möglichen Sekundärstrukturen der selektierten Moleküle von Interesse. Prinzipiell wiesen alle für die fünf untersuchten Moleküle berechneten Strukturen einen hohen Gehalt an doppelsträngigen Bereichen auf. Bild 4-36 zeigt exemplarisch die erhaltene Sekundärstruktur der Sequenz 2-4.

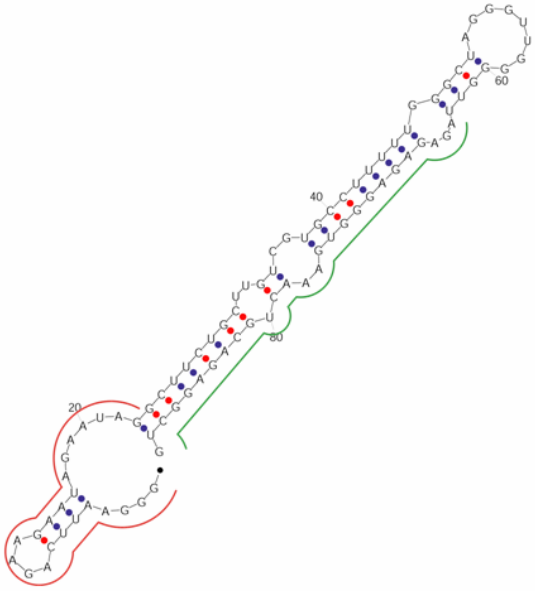

Bild 4-36: Mögliche Sekundärstruktur des Moleküls 2-4

Mit Hilfe der Software mfold wurden für die Sequenz 2-4 nach zwei Runden CE-SELEX für VP2 zwei mögliche Sekundärstrukturen berechnet, gezeigt ist die energetisch günstigere Form mit der freien Enthalpie von -27,7 kcal/mol; Kennzeichnung der beiden Primerbindungsstellen im RNA-Molekül (Primer Pool Fw und Primer Pool Rev)

4.6.4 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach zwei Runden CE-SELEX für VP2

Nach der erfolgreichen Herstellung reiner RNA aller fünf zu testenden Moleküle wurde mit diesen Sequenzen ein FBT dreimalig durchgeführt. Die Vorgehensweise dieser Experimente war dieselbe wie bei den FBT der virusbindenden Moleküle. Als einzige Abweichung wurde zunächst das rekombinant hergestellte Protein getestet. Dabei wurde jede markierte RNA mit einer Konzentration von 190 nM mit der in der eigentlichen Selektion eingesetzten VP2-Lösung inkubiert und anschließend auf die Filter aufgetragen. Nach Zentrifugation und Vermessen der einzelnen Proben im Szintillationszähler konnten die resultierenden Werte weiter untersucht werden. Bild 4-37 zeigt die auf Grundlage der ausgegebenen cpm-Werte berechnete prozentuale Bindung der selektierten Sequenzen, sowie der Kontroll-RNA an VP2.

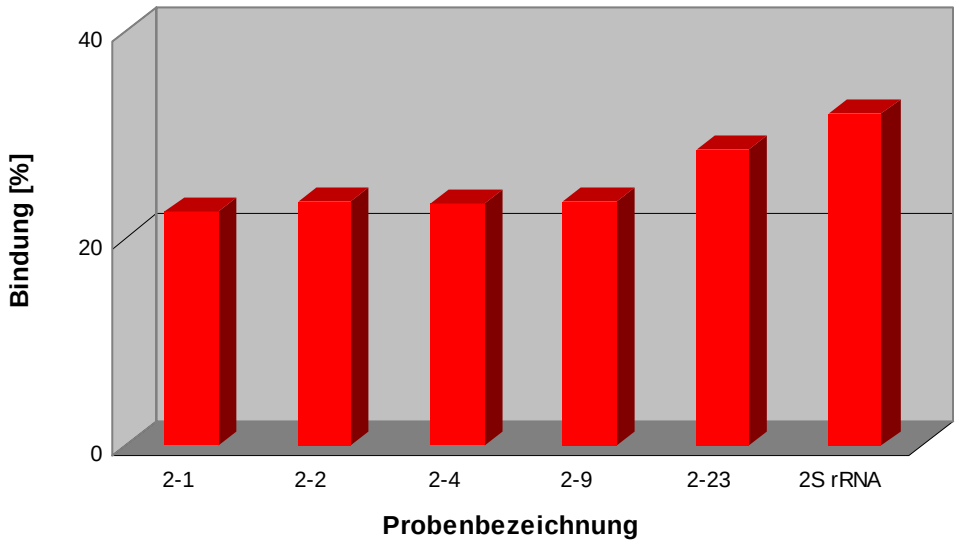

Bild 4-37: FBT der fünf ausgewählten Sequenzen nach zwei Runden CE-SELEX für VP2

Zur deutlicheren Darstellung der Unterschiede in der Bindungsintensität wurde die Skalierung der y-Achse nicht bis auf ein Maximum von 100 % erweitert

Unabhängig von der absoluten Bindungsstärke ließ sich an dieser Graphik überraschenderweise bei allen fünf selektierten Molekülen eine schlechtere Bindung als bei der Kontrolle nachweisen. Aufgrund dieser Tatsache wurde die restliche cDNA, die mittels RT-PCR hergestellt und nicht zur Ligation und Transformation eingesetzt worden war, abermals in RNA umgeschrieben, konzentriert und gereinigt. Sie stand danach in einer weiteren, dritten Selektionsrunde für VP2 zur Verfügung. Verwendet wurde die gleiche Anzahl an Zielmolekül wie in der zweiten Runde (1.000 x 11.400 Molekülen/50 nl) und ein RNA-Pool mit einer Konzentration von 250 µM. Wiederum ließ man die ungebundene RNA den Detektor passieren, brach den Selektionslauf ab und fing die noch in der Kapillare enthaltene Flüssigkeit auf. Nach Hybridiserung, RT und RT-PCR konnten 3 µl in einer erneuten Ligationsreaktion mit der DNA des Vektors pGEM®-T Easy fusioniert und nach einer Transformation ausgestrichen werden.

4.6.5 Charakterisierung der VP2-bindenden Aptamere nach drei Runden CE-SELEX

Nach Sequenzierung von 30 Klonen wurden diese mittels mfold strukturell untersucht. Wie zuvor beschrieben, wurden auch nach drei Runden CE-SELEX lediglich die fünf Sequenzen mit dem niedrigsten ΔG-Wert weiter analysiert (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-3: Berechnete ΔG-Werte der selektierten 90-mere nach drei Runden CE-SELEX für VP2

RNA-Bezeichnung	Anzahl der berechneten Sekundärstrukturen	Berechnete ΔG-Werte [kcal/mol]
3-1	5	-14.3 bis –14.6
3-2	4	-20.0 bis –21.0
3-8	2	-17.1 bis –17.6
3-10	2	-17.1 bis -17.5
3-14	2	-17.0 bis –17.4

Im Vergleich zu den in Tabelle 4-1 aufgeführten Daten der nach zwei Runden CE-SELEX für Protein selektierten Moleküle fiel auf, dass die ΔG-Werte nach drei Runden insgesamt höher als nach zwei Runden waren. Außerdem hatte sich die Anzahl an möglichen Sekundärstrukturen erhöht. Trotzdem sollten die fünf ausgesuchten RNA-Moleküle eingehender analysiert werden (Bild 4-38). Auch im direkten Vergleich der randomisierten Regionen aller bisher erhaltenen Sequenzen konnte keine signifikanten Ähnlichkeiten einzelner oder mehrerer Sequenzen zueinander festgestellt werden

3-1: 5′ - Primer Pool Fw - GCGTCCGGGCCTGTGCCGGGATGGGGGTTCTCCTTTGTGC - Primer Pool Rev - 3′

3-2: 5′ - Primer Pool Fw - GCGTTTGTCGTGTTGGGGCTTTTGCGCCTGTGGTTGGGGG - Primer Pool Rev - 3′

3-8: 5′ - Primer Pool Fw - CGTCGCGCTCCCAGACGTCAAGTGGGCTAACGGTATCTGT - Primer Pool Rev - 3′

3-10: 5′ - Primer Pool Fw - TTAGGGTGCACCGCGTGGGCCGTGGCAGCCGGCGGTGCTC - Primer Pool Rev - 3′

3-14: 5′ - Primer Pool Fw - TGGCGCTGCGTTGCTTCCATGGATGTGGTCGGCACGTCGT - Primer Pool Rev - 3′

Bild 4-38: Die randomisierten Bereiche der fünf ausgewählten Sequenzen nach drei Runden CE-SELEX für VP2

Bei der Betrachtung der berechneten Sekundärstrukturen waren das relativ hohe Vorkommen von einzelsträngigen Bereichen in allen Molekülen auffällig, was aber aufgrund der zuvor bekannten ΔG-Werte nicht überraschend war. In allen theoretisch berechneten Modellen waren nur kurze Doppelstrangbereiche zu ermitteln. Bei diesen Molekülen wurde die Struktur somit nur geringfügig von den festgelegten Primerbindungsstellen beeinflusst. Bild 4-39 zeigt beispielhaft für die anderen RNA-Moleküle eine mögliche Konformation für die Sequenz 3-1 mit einer freien Enthalpie von -14,6 kcal/mol.

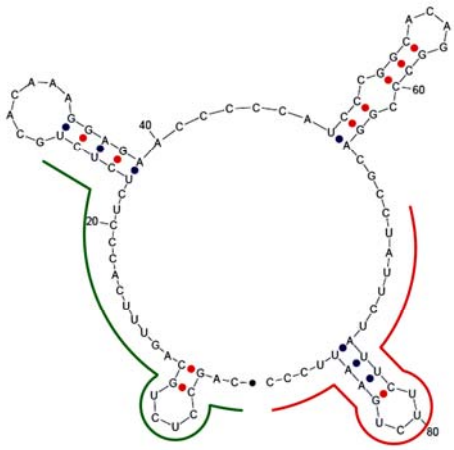

Bild 4-39: Mögliche Sekundärstruktur des Moleküls 3-1

Mit Hilfe der Software mfold wurden für die Sequenz 3-1 (nach drei Runden CE-SELEX für VP2 selektiert) fünf mögliche Sekundärstrukturen berechnet, dargestellt ist die energetisch günstigste Form mit der freien Enthalpie von -14,6 kcal/mol; Kennzeichnung der beiden Primerbindungsstellen im RNA-Molekül (Primer Pool Fw und Primer Pool Rev)

Die cDNA der fünf selektierten Sequenzen wurde in PCR-Reaktionen amplifiziert, in RNA transcribiert, konzentriert und gereinigt.

4.6.6 Filterbindungstests der selektierten Moleküle nach drei Runden CE-SELEX für VP2

Mit der gereinigten RNA aller fünf zu testenden Moleküle wurden Filterbindungstests mit VP2, BSA und M13-Phagen als Bindungspartner dreimalig durchgeführt. Die Vorgehensweise dieser Experimente war dieselbe wie bei den Filterbindungstests der Sequenzen der virusbindenden Strukturen (vgl. 3.8.5).

Filterbindungstest mit fünf ausgewählten Sequenzen und VP2

In diesem Experiment wurde jede radioaktiv markierte RNA mit einer Konzentration von 190 nM mit der in der eigentlichen Selektion eingesetzten VP2-Lösung inkubiert und anschließend auf die Filter aufgetragen und zentrifugiert. Die Werte nach der cpm-Bestimmung im Szintillationszähler konnten anschließend weiter untersucht werden. Die berechnete Bindung der ausgewählten Sequenzen und der Kontrolle an VP2 sind in Bild 4-40 gezeigt.

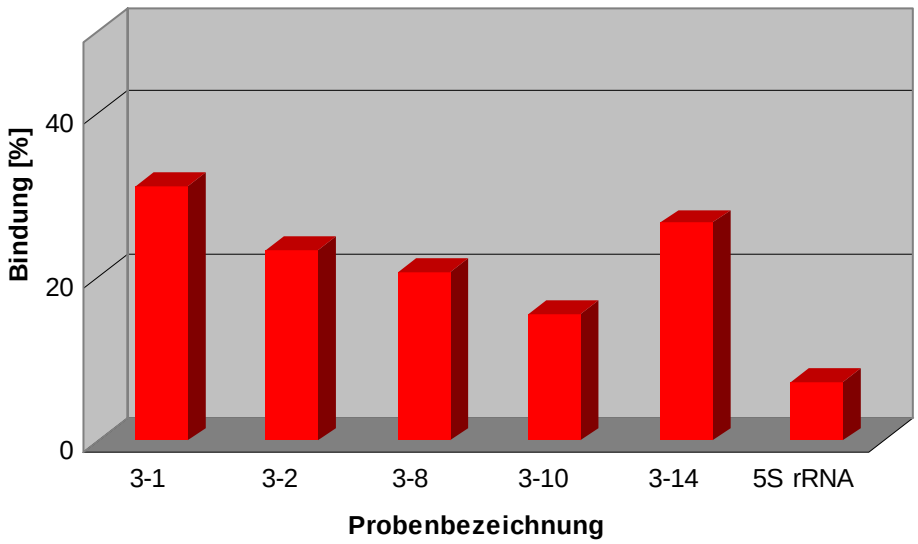

Bild 4-40: FBT der fünf ausgewählten Moleküle, die nach drei Runden CE-SELEX für VP2 erhalten wurden

Im Gegensatz zu den Bindungswerten der RNA-Moleküle der zweiten Selektionsrunde für Protein wiesen nun alle fünf Sequenzen eine eindeutig bessere Bindung an VP2 als die Kontrolle auf. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in der hier beschriebenen Dreifachbestimmung die Bindungsintensität der 5S rRNA in etwa um ein Drittel niedriger als in den zuvor durchgeführten Bindungsstudien war. Die unbedingte Umrechung der cpm-Werte in prozentuale Bindung ließ zumindest die Aussage einer schlechteren Bindung der Kontroll-RNA als beispielsweise des Moleküls 3-1 an das Zielmolekül VP2 zu. Die überzeugende Bindung des Moleküls 3-1 führte unabhängig von seiner berechneten Sekundärstruktur dazu, dass es eingehender hinsichtlich seines Bindungscharakters analysiert werden sollte.

Filterbindungstest von Sequenz 3-1

Die spezifische Bindung des RNA-Moleküls 3-1 sollte genauer untersucht werden. Deshalb wurde ein weiterer FBT in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Als Zielmoleküle standen dieses Mal dabei BSA und M13-Phagen, analog zu den unter 4.6.2 beschriebenen Bedingungen, bereit.

Die Stammlösung von BSA und M13-Phagen wurde auf 2,8 x 10^{-15} mol in 4,5 µl eingestellt, wobei sowohl Volumen, als auch Konzentration mit denen der eigentlichen Selektion und der vorangegangenen Experimente identisch waren. Eine 1:2-Verdünnung der BSA- und M13-Stammlösung in Selektionspuffer B wurde vorbereitet, der nach Abschluss der Faltung jeweils die gleiche Konzentration an RNA (190 nM) zugesetzt wurde. Als Kontrolle für das Zielmolekül wurden zudem identische Virusverdünnungen und für die RNA 5S rRNA eingesetzt. Die einzelnen Waschfraktionen wurden wie unter 3.8.5 beschrieben gewonnen und analysiert. In Bild 4-41 sind zunächst die prozentualen Anteile der mit Virus und BSA

inkubierten und auf dem Filter verbliebenen Fraktionen dargestellt, wobei Aptamer 3-1 und die 5S rRNA sich gegenübergestellt wurden.

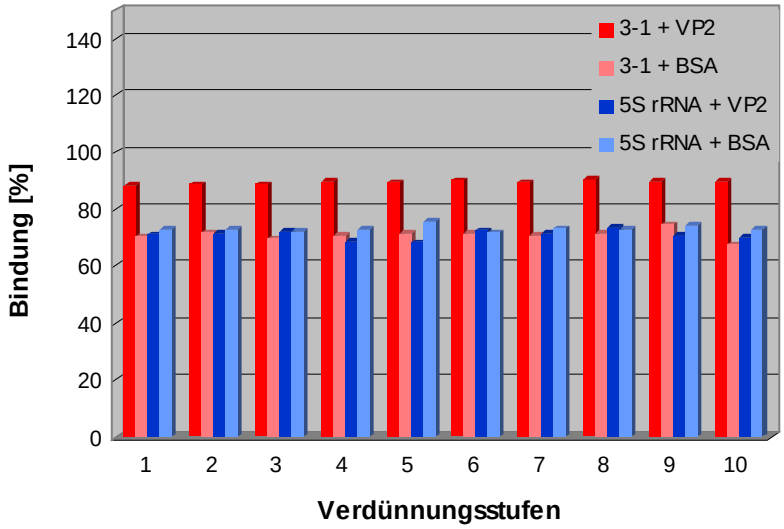

Bild 4-41: Prozentuale Anteile des radioaktiven Aptamers 3-1 und der 5S rRNA in den jeweiligen gebundenen Fraktionen

Als Kontrolle für die selektierte RNA diente 5S rRNA in derselben Konzentration; dargestellt sind beide Liganden in Beziehung zu den beiden Bindungspartnern VP2 und BSA

Wie man der Graphik entnehmen kann, erkannte das selektierte Aptamer sein eigentliches Traget VP2 in allen Verdünnungsstufen besser als das Kontroll-Molekül BSA. Im Gegensatz dazu zeigte die 5S rRNA in allen untersuchten Fällen eine schlechtere Bindung an das rekombinante Protein als an BSA. Aufgrund der kaum merklichen Veränderung der Bindungsintensität in den verschiedenen Verdünnungsstufen konnte auch hier nur eine allgemeine Tendenz abgelesen werden. Die gezeigten Ergebnisse waren bezüglich ihrer Aussagekraft über die spezifische Erkennung des VP2 durch die RNA 3-1 in unterschiedlichen Versuchsansätzen reproduzierbar.

Analog zu den beschriebenen Ergebnissen waren auch die Resultat der FBT mit M13-Phagen als Zielmoleküle zu interpretieren (Bild 4-42).

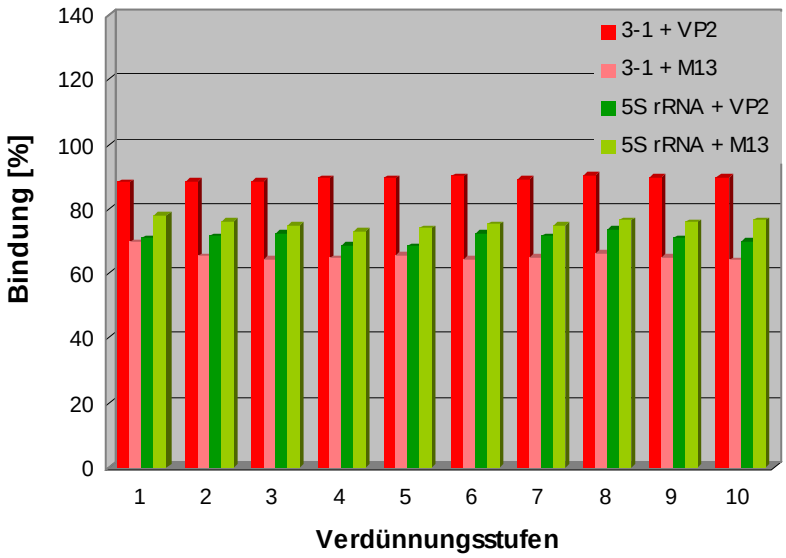

Bild 4-42: Prozentuale Anteile des radioaktiven Aptamers 3-1 und der 5S rRNA in den jeweiligen gebundenen Fraktionen

Die selektierte Sequenz 3-1 und die Kontroll-RNA 5S rRNA wurden bei diesen Versuchen jeweils mit VP2, bzw. mit M13-Phagen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert

In allen Verdünnungsstufen der eingesetzten Targets zeigte sich eine bessere Bindung der selektierten RNA 3-1 an ihr eigentliches Zielmolekül VP2 als an die M13-Phagen. Wie in den vorangegangenen Experimenten mit BSA erwies sich auch hier eine höhere Bindung der Kontroll-RNA an M13 als an VP2. Somit konnte auch in diesem Experiment eine spezifische Bindung der selektierten RNA 3-1 an ihr eigentliches Target VP2 nachgewiesen werden.
Vergleichend zu den FBT des für Virus selektierten Aptamers konnte man eine insgesamt höhere Bindungsintensität der hier untersuchten RNA feststellen. Allerdings erkannte das Aptamer 3-1 auch die Kontrollmoleküle BSA und M13 besser, als das Molekül 90-26 (vgl. 4.6.2).

Ermittlung der Dissoziationskonstante K_d des 3-1/VP2-Komplexes

Um die Berechnung des K_d-Werts für den 3-1/VP2-Komplex durchzuführen, wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen mit derselben Konzentration an Aptamer 3-1 inkubiert. Ebenso wurde mit der 5S rRNA als Gegenprobe verfahren. Der gesamte Versuchsablauf war prinzipiell identisch mit den beschriebenen Bindungstests. Allerdings stellte es sich als schwierig heraus, die genaue Dissoziationskonstante für die Sequenz 3-1 zu determinieren. Nach dem mit den beschriebenen Methoden keine eindeutigen Resultate zu erzielen waren, wurde versucht, mit Hilfe von unmarkierter RNA die Gesamtkonzentration an eingesetztem Liganden zu erhöhen. Dabei wurden RNA- Konzentrationen von 50 nM bis 1,5 µM verwendet, wobei sich in jeder RNA-Lösung 50 nM radioaktiv markierte RNA befanden und die endgültige Konzentration mit unmarkierter RNA eingestellt wurde. VP2 wurde in einer Konzentration von 50 nM dem Versuchsansatz von 10 µl hinzugefügt. Durch vielfache Wiederholungen der einzelnen Versuche und Variationen sowohl der RNA- als auch der Proteinkonzentration ließ sich kein eindeutiger K_d-Wert wie im Falle des Aptamers 90-26

ermitteln. Allerdings konnte durch die erhaltenen Werte eindeutig ermittelt werden, dass sich dieser Wert unterhalb von 500 x 10^{-9} M befinden muss.

4.6.7 Virusneutralisationstests mit den selektierten Aptameren 90-26 und 3-1

Vorbereitende Stabilitätsexperimente

Da versucht werden sollte, die Infektiösität von Cu-1 durch die Aptamere in der Zellkultur zu inhibieren, musste zunächst eine relative Stabilität der RNA-Moleküle in 1x PBS über einen gewissen Zeitraum gewährleistet werden. Dafür wurden die zu betrachtenden Sequenzen 90-26, 3-1 und 5S rRNA über unterschiedliche Zeiträume in 1x PBS bei 37 °C inkubiert. Durch diese Bedingungen wurden die Versuchsparameter der Virusneutralisationstests (VNT) imitiert. Nach 30, 60 und 120 min wurde je eine Probe pro Sequenz entnommen und vorerst auf Eis gelagert. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Strukturen im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsprobe gelelektrophoretisch untersucht. In Bild 4-43 sind die verschiedenen Proben nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen dargestellt. Keines der Aptamere zeigte Merkmale einer Degradation unter den beschriebenen Versuchsbedingungen. Die Kontroll-RNA blieb ebenfalls unversehrt.

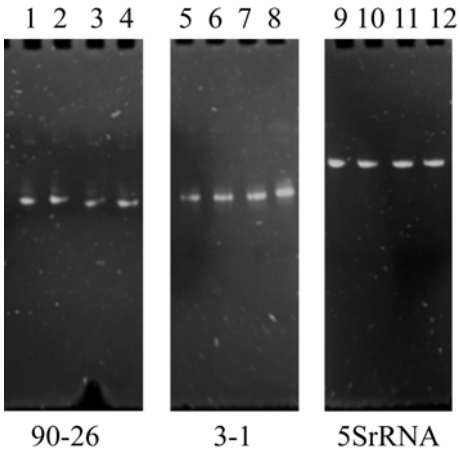

Bild 4-43: Gelelektrophoretische Analyse von Stabilitätsexperimenten

Auf ein 10 % Polyacrylamidgel wurden je 10 µl RNA aufgetragen und im Anschluss an die Trennung mit Ethidiumbromid gefärbt; 1: Aptamer 90-26 ohne Inkubation mit 1x PBS; 2: nach 30 min Inkubation; 3: nach 60 min Inkubation; 4: nach 120 min Inkubation in 1x PBS; 5: Aptamer 3-1 ohne Inkubation mit 1x PBS; 6: nach 30 min Inkubation; 7: nach 60 min Inkubation; 8: nach 120 min Inkubation in 1x PBS; 9: 5S rRNA ohne Inkubation mit 1x PBS; 10: nach 30 min Inkubation; 11: nach 60 min Inkubation; 12: nach 120 min Inkubation in 1x PBS

Die durch CE-SELEX gewonnenen und mittels Sekundärstrukturberechnung und Filterbindungstests analysierten Aptamere sollten in Virusneutralisationstests auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Virusinfektiösität untersucht werden. Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurden von Frau Angelika Schneider HEF in 6 cm-Kulturschalen ausgesät, um die notwendigen Monolayer zur Verfügung zu stellen (vgl. 3.9.1).

Die zu untersuchende RNA musste zunächst für den Versuch vorbereitet werden, was Re- und Denaturierung inklusive einer 1:2-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1,25 fmol bis 100 pmol einschloss. Außerdem musste das infektiöse Virus, dessen Titer in vorangegangenen Experimenten mit 2,2 x 10^7 nachgewiesen wurde, so stark in DMEM verdünnt werden, dass es eine auszuzählende Menge an Plaques (50 bis 100 Stück) produzieren konnte. Die Antikörperkontrollen, die das polykonale Serum B54 (pAk) und den monoklonalen Ak II/C3 (mAk) beinhalteten, wurden ebenfalls in einer 1:2-Verdünnung in 1x PBS vorbereitet.

Durchführung des Virusneutralisationstests

Im Anschluss an die einzelnen Verdünnungen wurden Virus und RNA, bzw. Antikörper miteinander für 30 min bei 41 °C inkubiert. Diese Parameter wurden direkt aus den eigentlichen Selektions- und Bindungsexperimenten übernommen, um die verschiedenen Versuche und deren Resultat untereinander vergleichen zu können. Nach der Inkubation wurden pro Verdünnung je zwei Kulturplatten mit je 200 µl Inokulum infiziert. Zusätzlich wurden auf zwei Platten Viruslösung ohne RNA oder Antikörper und auf zwei Platten nur 1x PBS aufgetragen. Die Platten inklusive Viruslösung sollten in der Auswertung des Tests eine auszählbare Menge von Plaques, die Platten ohne Virus hingegen die intakten Monolayer aufweisen. Alle Platten wurden über eine Stunde unter intermittierendem Schwenken bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden alle Überstände von den Platten abgelöst und diese mit Overlay I (vgl. 3.6.3) überschichtet. Nach einer weiteren Inkubationsphase von drei Tagen bei 37 °C konnte der Overlay II aufgetragen werden. Das in dieser Schicht vorhandene Neutralrot konnte bis auf den Zellrasen durchdringen und intakte Zellen stärker rot anfärben als die durch Virus verursachten Plaques. Eine anschließende Dokumentation aller Platten ermöglichte im Nachhinein das manuelle Auszählen der einzelnen Plaques und die darauf basierende Berechnung der Inhibition der Virusinfektiösität.

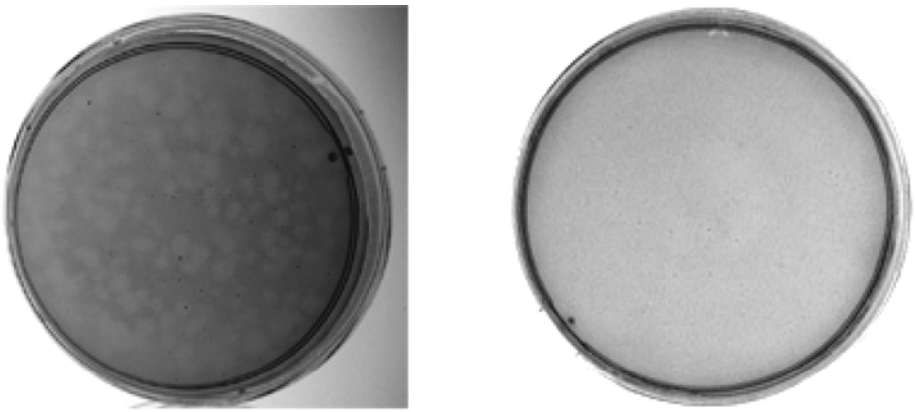

Bild 4-44: Kulturplatten mit virusinfiziertem bzw. intaktem Zellrasen

Beide Platten wurden nach Überschichtung mir Overlay II photografiert; die Positiv-Kontrolle wurde zuvor mit der im Versuch verwendeten Ausgangskonzentration der Viruslösung, die Negativ-Kontrolle wurde lediglich mit 1x PBS inkubiert

Die beiden in Bild 4-44 gezeigten Platten dienten in einer Doppelbestimmung als Grundlage für die anschließende Auswertung der Plaques und als Qualitätskontrolle für die prinzipielle Durchführbarkeit des Versuches. Die Anzahl der in der Positiv-Kontrolle zu ermittelnden Plaques wurde in Relation zu den auf den Platten mit Aptamer- bzw. Antikörperverdünnungen gesetzt und ließ somit die Bewertung der Hemmung der Infektiösität des Virus zu.

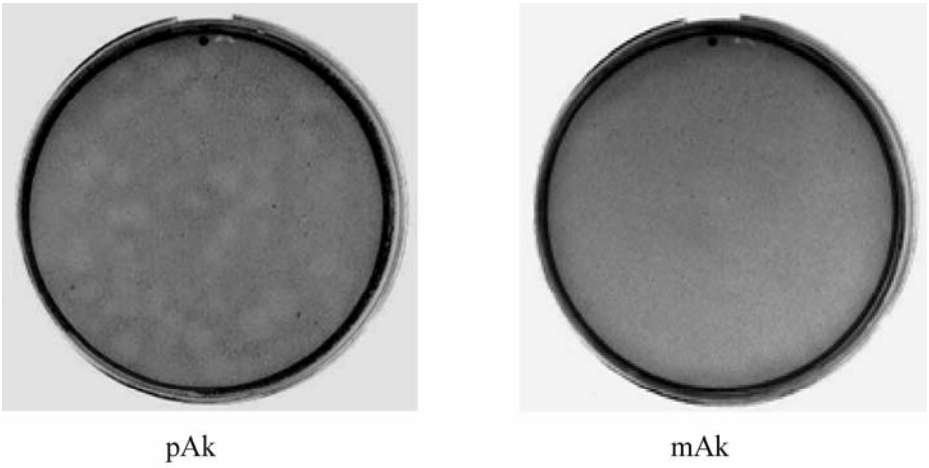

Bild 4-45: HEF-Monolayer, inkubiert mit polyklonalem, bzw. monoklonalem Antikörper

Beide Platten dienten zur Kontrolle und zum Vergleich der RNA-Moleküle mit den gebräuchlichen IBDV-Antikörpern; pAk: Inkubation der Platte mit Virus und pAk B54; mAk: Inkubation der Platte mit Virus und mAk II/C3

Wie im Vergleich von Bild 4-46 mit Bild 4-45 ersichtlich, konnte durch die Inkubation des Virus mit pAk eine Verringerung der Plaqueanzahl erreicht werden. Wie zu erwarten, führte eine Behandlung des Virus mit mAk zu einer fast vollständigen Aufhebung der Virusinfektiösität. Die Betrachtung der mit den Virus-Lösungen inkubierten Platten brachte nun Aufschluss über die *in vivo*-Tauglichkeit der selektierten Aptamere.

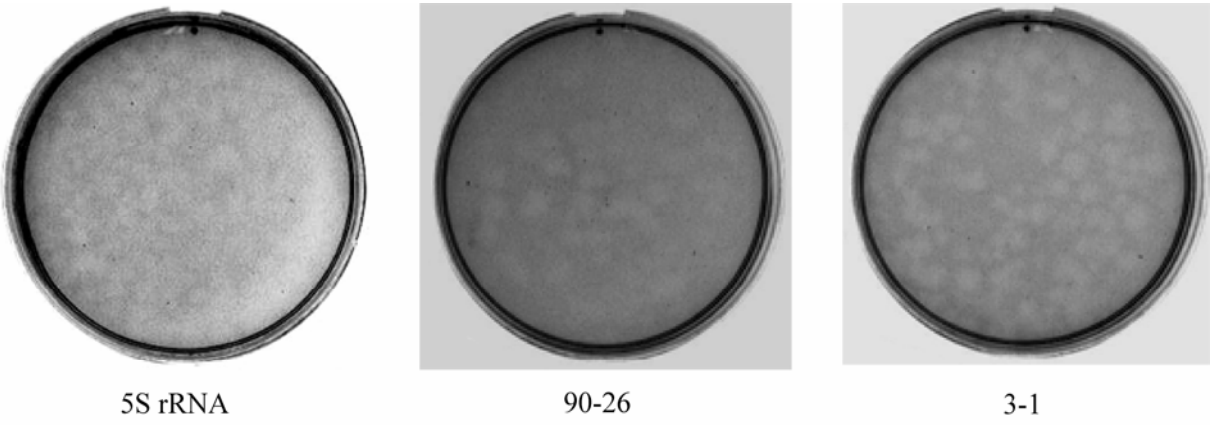

Bild 4-46: Kulturplatten mit Virus und verschiedenen RNA-Molekülen inkubiert

5S rRNA: Zellrasen, inkubiert mit Virus und Kontroll-RNA; 90-26: HEF, inkubiert mit Virus und für Virus selektiertem Aptamer 90-26; 3-1: Zellrasen, behandelt mit Virus und für VP2 selektiertem Aptamer 3-1

In allen Konzentrationen der Kontrolle (5S rRNA) konnte keine Reduktion der Plaquemenge im Vergleich zu den Aptameren beobachtet werden. Die Behandlung der Viruslösung mit

beiden Aptameren führte zu einer signifikanten Hemmung der Infektiösität (vgl. Bild 4-46). Im visuellen Vergleich der mit den Aptameren behandelten Platten mit den mit mAk inkubierten Platten konnte die Neutralisationseigenschaft des mAk offensichtlich nicht erreicht werden. Hierzu ist aber anzumerken, dass zum Zeitpunkt der Versuche keine Möglichkeit bestand, die wirkliche Konzentration des mAk zu ermitteln, d.h. annähernd gleiche Konzentrationen von mAk und Aptameren einzusetzen. Deswegen konnte anhand dieser Versuche kein direkter quantitativer Vergleich zwischen vorhandenen IBDV-Antikörpern und selektierten Aptameren bezüglich ihrer Fähigkeit zur Neutralisation gezogen werden. Auf jeden Fall wurden die Anwendbarkeit der Aptamere im Virusneutralisationstest und ihre neutralisierende Eigenschaft bewiesen.
Neben der visuellen Beurteilung der Plaqueanzahl wurden alle Plaques einer Platte gezählt und in Relation zur Anzahl der Plaques der Positiv-Kontrolle (100 Plaques) gesetzt.
Bei der rechnerischen Auswertung der einzelnen Daten fiel auf, dass bei der Verwendung von 100 fmol RNA reproduzierbar eine Reduktion der Plaqueanzahl durch beide Aptamere erreicht werden konnte (Bild 4-47).

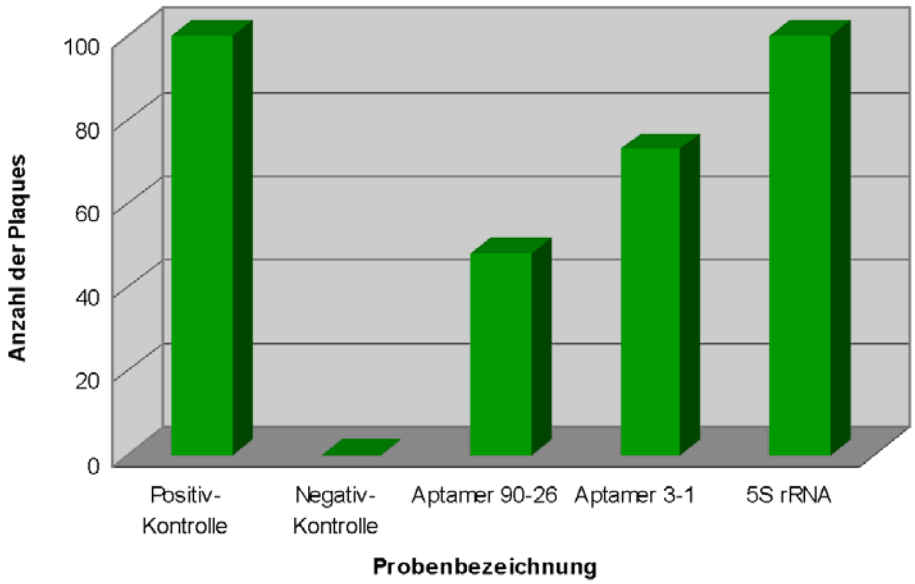

Bild 4-47: Plaqueanzahl unter Verwendung einer RNA-Konzentration von 100 fmol

Aufgetragen sind die Positiv-Kontrolle ohne Aptamer, die Negativ-Kontrolle ohne Virus, sowie das für das komplette Virus selektierte Aptamer 90-26, das für das rekombinante VP2 selektierte Aptamer 3-1 und die Kontroll-RNA (5S rRNA)

Das Resultat eines Virusneutralisationstest mit der zehnfachen Konzentration an RNA (10 pmol) ist in Bild 4-48 präsentiert.

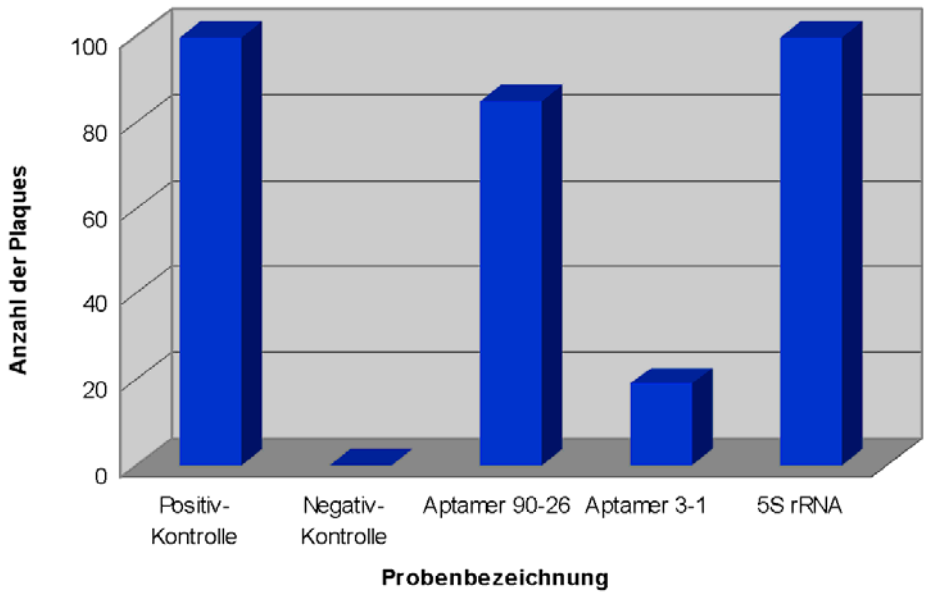

Bild 4-48: Darstellung der Plaqueanzahl unter Verwendung einer RNA-Konzentration von 10 pmol

Gezeigt sind wiederum Positiv- und Negativ-Kontrolle, sowie die Aptamere 90-26 und 3-1, inklusive der Gegenprobe (5S rRNA)

Im Unterschied zum vorangegangenen Virusneutralisationstest mit RNA-Konzentrationen von 100 fmol, konnte in diesem Test eine stärkere Inhibition der Virusinfektiösität durch das für das VP2-Aptamer 3-1 gezeigt werden. Allerdings wurde dieser Versuch im Vergleich zu den in Bild 4-47 gezeigten Experiment nur einmalig durchgeführt. Aufgrund der vorangegangenen Experimente kann eine deutliche Reduktion der Plaqueanzahl für beide Aptamere als reproduzierbar angesehen werden, die nicht alleine auf die Anwesenheit von RNA, sondern auf eine spezifische Bindung zurückzuführen war. Die Abhängigkeit der Plaqueanzahl von der eingesetzten Aptamerkonzentration konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden und muss somit in Frage gestellt werden.

4.7 Ausblick

Da im Falle des 3-1/VP2-Komplexes bislang keine eindeutige Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte, müsste ein alternativer Bindungstest entwickelt werden. Die bisherigen Bindungsstudien haben sich auf Filterbindungs- und Virusneutralisationstests bezogen. Gel-Shift-Assays werden im Bereich der Überprüfung von virusbindenden Sequenzen zwar eingesetzt, konnten aber in unserer Gruppe noch nicht standardisiert zur Anwendung kommen. Eine attraktive Alternative zu allen radioaktiven Bindungsstudien wäre die Studie beider Bindungspartner und des von ihnen gebildeten Komplexes mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Da ein geeignetes Gerät mittlerweile zur

Verfügung steht, könnte man vorher mittels CE-SELEX gewonnene RNA-Moleküle Fluoreszenzmarkieren und ihre Bindungsspezifität und -affinität anschließend im FCS analysieren. Würde man für den eigentlichen Selektionsvorgang im Vorfeld fluoreszenzmarkierte Moleküle in einem Ausgangspool anwenden, könnte man mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors in der Kapillarelektrophorese bereits vor der FCS-Messung fluoreszierende Farbstoffe verwenden und müsste erhaltene Sequenzen nicht mehr im Nachhinein markieren.

Ein weiterer Punkt wäre, dass von allen nach CE-SELEX erhaltenen Klonen nur ein Bruchteil eingehend analysiert wurde. Eine Weiterentwicklung der bisherigen Screeningverfahren zur Überprüfung der Bindung aller selektierten Moleküle könnte zur Identifikation noch effizienterer Binder beitragen. Außerdem könnte man zusätzliche Selektionsrunden einbauen, um Liganden mit höheren K_d-Werten zu erhalten, die eventuell auch medizinisch einsetzbar wären.

Es wäre außerdem zu überlegen, ob man versucht, den Komplex VP2-Aptamer zu kristallisieren. Durch die Erkennungssequenz für die AcTEV™ Protease könnten die für die Reinigung notwendigen Tags abgespalten werden und das Protein würde wieder in einer der natürlichen Konformation sehr ähnlichen Form vorliegen. Eine Kristallstruktur des Proteins im Komplex mit dem daran gebundenen Aptamer könnte nähere Informationen über die Bindung geben.

Weitere Virusneutralisationsversuche mit annähernd gleichen Konzentrationen von Kontroll-Antikörpern und zu analysierenden RNA-Molekülen würden einen direkten Vergleich zwischen beiden Spezies zulassen und den *in vivo*-Einsatz von Aptameren untermauern. Zudem könnten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit anderen Viren überprüft werden und therapeutische Ansätze weiter ausgebaut werden. Eingehende Strukturuntersuchungen der vorhandenen Aptamere mit ihren Bindungspartnern könnten den Neutralisationsmechanismus von Viren aufklären und zur Entwicklung von antiviralen Arzneimitteln beitragen. Solche Medikamente könnten in unterschiedlichen Applikationsformen in der Human- und in der Veterinärmedizin eingesetzt werden.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Methode des CE-SELEX für Viren und Proteine könnten sowohl RNA- als auch DNA-Aptamere für zahlreiche Moleküle in kürzester Zeit identifiziert und angereichert werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit waren die Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren, spezifisch für das Virus der Infektiösen Bursitis und das rekombinant hergestellte virale Protein VP2.

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere für IBDV und sein VP2 spezifische RNA-Moleküle mittels Kapillarelektrophorese selektiert werden, wobei die beiden eingesetzten Zielmoleküle, der deutsche IBDV-Stamm Cu-1 und das gentechnisch hergestellte VP2, selbst hergestellt und gereinigt werden mussten. Die Selektion mit Kapillarelektrophorese, einer Abwandlung der klassischen SELEX-Experimente, konnte als eine kostengünstige und schnelle Methode zur Aptamergewinnung in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

Die nach einer unterschiedlichen Anzahl von Selektionsrunden erhaltenen RNA-Moleküle wurden in DNA umgeschrieben und mittels RT-PCR amplifiziert und standen dadurch weiteren Selektionsrunden zur Verfügung. Je fünf Moleküle wurden in radioaktiven Filterbindungstest näher untersucht, wobei nach zwei Runden CE-SELEX für das komplette Virus und nach drei Runden für das Protein spezifisch bindende Sequenzen ermittelt werden konnte.

Von den beiden Gruppen der bindenden RNA-Sequenzen wurde je ein Molekül weiter in theoretischen Sekundärstrukturanalysen und radioaktiven Bindungsstudien mit unterschiedlichen Bindungspartnern untersucht. Für beide Moleküle konnte ihre Spezifität hinsichtlich ihres Targets eindeutig nachgewiesen werden. Im Fall des für das Virus selektierten Aptamers 90-26 lies sich ein K_d von 132,81 x 10^{-9} M ermitteln. Für das Aptamer 3-1 konnte lediglich ein ungefährer K_d von unter 500 x 10^{-9} M verifiziert werden.

In Virusneutralisationsexperimenten wurde eine signifikante Reduktion der Virusinfektiösität durch die beiden selektierten Aptamere gezeigt. Beide Moleküle schienen neutralisierende Merkmale zu besitzen und ließen sich in den beschriebenen *in vivo*-Versuchen ohne Anzeichen einer Degradation untersuchen.

6 Conclusions

The aim of this study was the identification and characterisation of binding RNA-molecules, so called aptamers, specific for the virus of the infectious bursal disease (IBDV) in chickens and its viral protein VP2.

The applied technique for the selection of aptamers was a variation of the classical selection method, which is known as SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). The use of only two to three selection cycles instead of the usually number of eight to twelve cycles is near the circumvention of the immobilisation of the target the biggest advantage of this method.

The both target molecules were on the one hand complete virus-particles, on the other hand recombinant produced VP2. The virus had to be multiplied and purified, whereas the protein was expressed in *E. coli* cells and purified via affinity chromatography. Both molecules have been incubated with a single stranded RNA-pool. In a following separation step, using CE-SELEX, unbound RNA was separated from the target-RNA complex. The binding sequences were amplified and investigated in radioactive filter binding assays. The K_d value for one aptamer specific for the virus was determined as 132.81×10^{-9} M, the K_d for a protein-binding aptamer could be determined in the range of 500×10^{-9} M.

In virus neutralisations assays both aptamers showed a significant reduction of the viral infectivity and seemed therefore as interesting tools for further investigations of virus-molecule-interactions.

The described technique of CE-SELEX could be used as an interesting alternative to the classical SELEX-methods, which was demonstrated in this work. Almost every molecule could serve as a potential target and RNA- as well as DNA-pools could be used to provide possible binders. The radioactive binding assays could be completed by the investigation of fluorescence-labelled aptamers, using fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

In future experiments, one could use the expressed and purified VP2 single and in complex with its binding partner for crystallisation experiments, in order to get detailed information of their binding. One could also develop competitive neutralisation-assays with the selected aptamers and existing monoclonal antibodies. In addition to all these experiments, the results could be used for further investigation of other viruses and the development of therapeutically advices of aptamers in the field of veterinary science.

7 Literaturverzeichnis

Allan, W. H., Faragher, J. T., und Cullen, G. A. (1972): Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. *Vet Rec* **90**, 511-2.

Azad, A. A., Barrett, S. A., und Fahey, K. J. (1985): The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* **143**, 35-44.

Azad, A. A., Jagadish, M. N., Brown, M. A., und Hudson, P. J. (1987): Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* **161**, 145-52.

Bartel, D. P., und Szostak, J. W. (1993): Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science* **261**, 1411-8.

Bayliss, C. D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R. W., Papageorgiou, A., Müller, H., und Boursnell, M. E. (1990): A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol* **71 (Pt 6)**, 1303-12.

Beaudry, A. A., und Joyce, G. F. (1992): Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* **257**, 635-41.

Becht, H., und Müller, H. (1991): Infectious bursal disease--B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. *Behring Inst Mitt*, 217-25.

Becht, H., Müller, H., und Müller, H. K. (1988): Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **69 (Pt 3)**, 631-40.

Berglund, J. A., Charpentier, B., und Rosbash, M. (1997): A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* **25**, 1042-9.

Brown, M. D., Green, P., und Skinner, M. A. (1994): VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol* **75 (Pt 3)**, 675-80.

Bukh, J., Miller, R. H., und Purcell, R. H. (1995): Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* **15**, 41-63.

Chang, H. C., Lin, T. L., und Wu, C. C. (2003): DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* **21**, 507-13.

Cheville, N. F. (1967): Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am J Pathol* **51**, 527-51.

Cosgrove, A. (1962): An apparently new disease of chickens avian nephrosis. *Avian Dis* **6**, 385-9.

Cursiefen, D., Kaufer, I., und Becht, H. (1979): Loss of virulence in a small plaque mutant of the infectious bursal disease virus. *Arch Virol* **59**, 39-46.

Darteil, R., Bublot, M., Laplace, E., Bouquet, J. F., Audonnet, J. C., und Riviere, M. (1995): Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* **211**, 481-90.

Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H., und Teninges, D. (1979): Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* **32**, 593-605.

Dulbecco, R., und Vogt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* **99**, 167-82.

Dybing, J. K., und Jackwood, D. J. (1998): Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Dis* **42**, 80-91.

Ellington, A. D., und Szostak, J. W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-22.

Eterradossi, N., Picault, J. P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., und Bennejean, G. (1992): Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *Zentralbl Veterinarmed B* **39**, 683-91.

Fahey, K. J., O'Donnell, I. J., und Azad, A. A. (1985): Characterization by Western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **66 (Pt 7)**, 1479-88.

Faragher, J. T., Allan, W.H., Wyeth, P.J. (1974): Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet Rec* **95**, 385-8.

Fodor, I., Horvath, E., Fodor, N., Nagy, E., Rencendorsh, A., Vakharia, V. N., und Dube, S. K. (1999): Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung* **47**, 481-92.

Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., und Langlois, P. (2004): Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* **22**, 2351-60.

Fukuda, K., Vishinuvardhan, D., Sekiya, S., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kumar, P. K., und Nishikawa, S. (1997): Specific RNA aptamers to NS3 protease domain of hepatitis C virus. *Nucleic Acids Symp Ser*, 237-8.

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.

Hanes, J., und Plückthun, A. (1997): In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4937-42.

Hitchner, S. (1971): Persistence of parental infectious bursal disease antibody and its effect on susceptibility of young chickens. *Avian Dis* **15**, 894-900.

Hjertén, S. (1967): Free Zone Electrophoresis. *Chromatogr. Rev.* **9**, 122-239.

Hjertén, S., Elenbring, K., Kilar, F., Liao, J. L., Chen, A. J., Siebert, C. J., und Zhu, M. D. (1987): Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus. *J Chromatogr* **403**, 47-61.

Homann, M., und Goringer, H. U. (1999): Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* **27**, 2006-14.

Homann, M., und Goringer, H. U. (2001): Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic "piggy-back" approach. *Bioorg Med Chem* **9**, 2571-80.

Hu, Y. C., Bentley, W. E., Edwards, G. H., und Vakharia, V. N. (1999): Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng* **63**, 721-9.

Hudson, P. J., McKern, N. M., Power, B. E., und Azad, A. A. (1986): Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* **14**, 5001-12.

Jackwood, D. H., Saif, Y. M., und Hughes, J. H. (1987): Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian Dis* **31**, 370-5.

Jeon, S. H., Ben-Yedidia, T., und Arnon, R. (2002): Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. *Vaccine* **20**, 2772-80.

Jeon, S. H., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T., und Arnon, R. (2004): A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem* **279**, 48410-9.

Joshi, P., und Prasad, V. R. (2002): Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). *J Virol* **76**, 6545-57.

Jurk, M. (1998): Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin*, 553-555.

Kainz, S., Czaja, R. Greiner-Stöffele, T. und Hahn, U. (in press): Selection of RNase-Resistant RNAs. *Handbook of Experimental Pharmacolog* **173** Springer Press

Käufer, I., und Weiss, E. (1980): Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun* **27**, 364-7.

Kibenge, F. S., Jackwood, D. J., und Mercado, C. C. (1990): Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **71 (Pt 3)**, 569-77.

Kibenge, F. S., Nagarajan, M. M., und Qian, B. (1996): Determination of the 5' and 3' terminal noncoding sequences of the bi-segmented genome of the avibirnavirus infectious bursal disease virus. *Arch Virol* **141**, 1133-41.

Kibenge, F. S., Qian, B., Nagy, E., Cleghorn, J. R., und Wadowska, D. (1999): Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res* **63**, 49-55.

Kuhn, R., und Hoffstetter-Kuhn, S. (1993): Capillary Electrophoresis: Principles ans Practice. *Springer Laboratory*.

Kumar, P. K., Machida, K., Urvil, P. T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K., und Nishikawa, S. (1997): Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* **237**, 270-82.

Lam, K. M. (1998): Alteration of chicken heterophil and macrophage functions by the infectious bursal disease virus. *Microb Pathog* **25**, 147-55.

Lange, H. (1985): Die Bildung und interferierende Wirkung inkompletter Partikel des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV). *[Dissertation med. vet] Univ. Gießen*.

Lange, H., Müller, H., Kaufer, I., und Becht, H. (1987): Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. *Arch Virol* **92**, 187-96.

Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C., und Delmas, B. (2000): Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol* **81**, 983-92.

Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., und Rodriguez, J. F. (2000): VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **277**, 345-57.

Lorger, M., Engstler, M., Homann, M., und Goringer, H. U. (2003): Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. *Eukaryot Cell* **2**, 84-94.

Mahardika, G. N., und Becht, H. (1995): Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol* **140**, 765-74.

Martinez-Torrecuadrada, J. L., Caston, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F., und Casal, J. I. (2000): Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* **278**, 322-31.

McFerran, J. B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., et al. (1980): Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* **9**, 395-404.

Mendonsa, S. D., und Bowser, M. T. (2004): In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc* **126**, 20-1.

Mendonsa, S. D., und Bowser, M. T. (2005): In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc* **127**, 9382-3.

Müller, H., und Becht, H. (1982): Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol* **44**, 384-92.

Müller, H., Islam, M. R., und Raue, R. (2003): Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol* **97**, 153-65.

Müller, H., und Nitschke, R. (1987a): Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **176**, 113-21.

Müller, H., und Nitschke, R. (1987b): The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* **159**, 174-7.

Müller, H., Schnitzler, D., Bernstein, F., Becht, H., Cornelissen, D., und Lutticken, D. H. (1992): Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. *Vet Microbiol* **33**, 175-83.

Müller, R., Kaufer, I., Reinacher, M., und Weiss, E. (1979): Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl Veterinarmed B* **26**, 345-52.

Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

Nick, H., Cursiefen, D., und Becht, H. (1976): Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J Virol* **18**, 227-34.

Öppling, V., Muller, H., und Becht, H. (1991): The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes. *J Gen Virol* **72 (Pt 9)**, 2275-8.

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.

Phenix, K. V., Wark, K., Luke, C. J., Skinner, M. A., Smyth, J. A., Mawhinney, K. A., und Todd, D. (2001): Recombinant Semliki Forest virus vector exhibits potential for avian virus vaccine development. *Vaccine* **19**, 3116-23.

Pitcovski, J., Di-Castro, D., Shaaltiel, Y., Azriel, A., Gutter, B., Yarkoni, E., Michael, A., Krispel, S., und Levi, B. Z. (1996): Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis* **40**, 753-61.

Pringle, C. R. (1998): The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Arch. Virol.* **143**, 203-10.

Rautenschlein, S., Yeh, H. Y., Njenga, M. K., und Sharma, J. M. (2002): Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* **147**, 285-304.

Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Manniatis, T. (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York* **3. Aufl.**

Sanchez, A. B., und Rodriguez, J. F. (1999): Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* **262**, 190-9.

Schneider, D. J., Feigon, J., Hostomsky, Z., und Gold, L. (1995): High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry* **34**, 9599-610.

Schnitzler, D., Bernstein, F., Muller, H., und Becht, H. (1993): The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* **74 (Pt 8)**, 1563-71.

Sharma, J. M., und Fredericksen, T. L. (1987): Mechanism of T cell immunosuppression by infectious bursal disease virus of chickens. *Prog Clin Biol Res* **238**, 283-94.

Sharma, J. M., und Lee, L. F. (1983): Effect of infectious bursal disease on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: role of adherent cells in cellular immune suppression. *Infect Immun* **42**, 747-54.

Sharp, P. A., Sugden, B., und Sambrook, J. (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-63.

Shaw, I., und Davison, T. F. (2000): Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine* **18**, 3230-41.

Smith, G. P. (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7.

Snyder, D. B., Vakharia, V. N., und Savage, P. K. (1992): Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol* **127**, 89-101.

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

Tuerk, C., MacDougal, S., und Gold, L. (1992): RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6988-92.

Ulrich, H., Magdesian, M. H., Alves, M. J., und Colli, W. (2002): In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of Trypanosoma cruzi and inhibit cell invasion. *J Biol Chem* **277**, 20756-62.

Vakharia, V. N., He, J., Ahamed, B., und Snyder, D. B. (1994): Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res* **31**, 265-73.

Vakharia, V. N., Snyder, D. B., He, J., Edwards, G. H., Savage, P. K., und Mengel-Whereat, S. A. (1993): Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *J Gen Virol* **74 (Pt 6)**, 1201-6.

Van der Marel, P., Snyder, D., und Lutticken, D. (1990): Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **97**, 81-3.

Wang, J., Jiang, H., und Liu, F. (2000): In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *Rna* **6**, 571-83.

Wang, X., Jiang, P., Deen, S., Wu, J., Liu, X., und Xu, J. (2003): Efficacy of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens enhanced by coadministration with CpG oligodeoxynucleotide. *Avian Dis* **47**, 1305-12.

Whitfill, C. E., Haddad, E. E., Ricks, C. A., Skeeles, J. K., Newberry, L. A., Beasley, J. N., Andrews, P. D., Thoma, J. A., und Wakenell, P. S. (1995): Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis* **39**, 687-99.

Winterfield, R. W., Fadly, A. M., und Bickford, A. (1972): Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken. Persistence of the virus and lesions. *Avian Dis* **16**, 622-32.

Yamamoto, R., Katahira, M., Nishikawa, S., Baba, T., Taira, K., und Kumar, P. K. (2000): A novel RNA motif that binds efficiently and specifically to the Ttat protein of HIV and inhibits the trans-activation by Tat of transcription in vitro and in vivo. *Genes Cells* **5**, 371-88.

Yan, A. C., Bell, K. M., Breeden, M. M., und Ellington, A. D. (2005): Aptamers: prospects in therapeutics and biomedicine. *Front Biosci* **10**, 1802-27.

Yao, K., und Vakharia, V. N. (2001): Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology* **285**, 50-8.

Youngner, J. S. (1954): Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**, 202-5.

Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Ulrich Hahn, der mich inklusive IBDV-Thematik in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, mich geduldig in die RNA-Welt eingeführt und mit nach Hamburg genommen hat. Er war stets an Fortschritt und Problematik meiner Arbeit interessiert und unterstützte mich nicht zuletzt durch optimale Arbeitsbedingungen und ein immerwährendes freundliches Arbeitsklima.

Herrn Prof. Hermann Müller danke ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas, für die Bereitstellung an Virus und die Wiederaufnahme in seine Labors in Leipzig, um die beschriebenen Virusneutralisationstests durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. Edzard Spillner möchte ich mich für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion, für seine konstruktive Kritik und für seinen unerschöpflichen Ideenreichtum bedanken.

Allen Mitgliedern der Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie möchte ich für ihre fachliche und seelische Unterstützung danken, durch die sie mir eine sehr schöne Zeit während der Promotion ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rico Czaja, der über ein unvorstellbares Pensum an Geduld verfügt und zu jeder Tages- und Nachtzeit für EDV- und RNA-Probleme zur Verfügung stand.

Herrn Heiko Fickert danke ich dafür, dass er so ist, wie er ist, dass er mich in fachlicher Hinsicht immer gefordert und gefördert hat und dass er mir an unzählbaren Wochenenden und Abenden im Labor eine so angenehme und unterhaltsame Gesellschaft war.

Bei Frau Elena Hensel möchte ich mich für ihre Mitarbeit an diversen Teilprojekten meiner Arbeit bedanken. Sie war immer ein ruhender Pol und hat mich in der Praktikumsbetreuung bestens unterstützt.

Herrn Michael Knauer aus Ontario, Kanada danke ich für seine Mithilfe an meiner Arbeit während seines dreimonatigen DAAD-Austauschs. Er war eine willkommene Bereicherung für unser Labor und hat durch seine schnelle Auffassungsgabe und seine Selbständigkeit viel zum Gelingen dieser Promotion beigetragen.

Ich danke weiterhin Frau Daniela Otto, die uns durch ihren unermüdlichen bürokratischen Einsatz ein konzentriertes und effizientes Arbeiten im Labor ermöglicht hat und mir mitsamt ihrer bald vollständigen Familie immer freundschaftlich verbunden sein wird.

Dem SFB 610 danke ich für die finanzielle Unterstützung in den ersten Jahren und die anregenden und informativen Workshops in Machern und Lutherstadt Wittenberg.

Bei Herrn Atillâ Çoksezen möchte ich mich für seine Nervenstärke, seinen Optimismus und sein Verständnis bedanken.

Frau Hannah Schröder-Borm danke ich für ihre Fürsorge, ihre Ratschläge und die anregenden Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Margaretha und Hans-Peter Kainz, und meinem Bruder Lukas Kainz für ihre finanzielle Unterstützung und ihr Verständnis für alle Höhen und Tiefen meines bisherigen beruflichen Weges danken.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.
Ergebnisse aus Projekt-Arbeiten, die in diesem Arbeitskreis angefertigt wurden und die teilweise in diese Arbeit eingeflossen sind, wurden von mir initiiert und unter meiner Anleitung angefertigt.

Hamburg, den 29. Dezember 2005

Sabine Kainz