

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Alzheimer

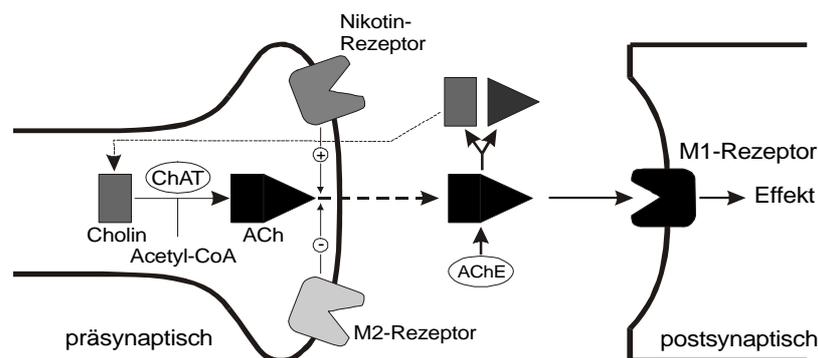
Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung. Sie tritt vor allem im Alter auf und zeichnet sich durch das Absterben von Neuronen aus. Bemerkbar macht sich dies beim Patienten anfänglich durch Vergeßlichkeit, schreitet jedoch dann immer weiter fort, bis schließlich die Sprache und Steuerung des Körpers versagt. Der völlige geistige Verfall und der Verlust der Persönlichkeit, häufig begleitet von psychiatrischen Begleiterscheinungen, endet nach durchschnittlich 7-10 Jahren mit dem Tod.

Erstmals beschrieben wurde diese Krankheit 1906 von Alois Alzheimer. Er hat extrazelluläre Ablagerungen eines extrem unlöslichen Peptids im Gehirn beobachtet, die sogenannten senilen Plaques, und diese erstmals mit der Krankheit in Zusammenhang gebracht (Alzheimer, 1907). Da das Peptid aufgrund der Unlöslichkeit nicht analysiert werden konnte, jedoch positiv auf Cellulosenachweise reagierte, wurde es von Rudolph Virchow bereits 1854 als Amyloid bezeichnet (Virchow, 1854). Erst 1984 gelang die Bestimmung der Aminosäuresequenz des Peptids (Glenner & Wong, 1984a, Masters *et al.*, 1985a, b) und dadurch auch später die Identifizierung des Gens.

Neben den Amyloid-Plaques sind noch zwei weitere Veränderungen in den Gehirnen der Patienten zu beobachten. Das sogenannte Tau-Protein, ein Mikrotubuli-assoziiertes Phosphoprotein (Goedert *et al.*, 1991), tritt in einer degenerierten Form auf. Im Verlauf der Krankheit wird dieses Protein hyperphosphoryliert und glykosyliert, wodurch es seine stabilisierende Funktion auf die Mikrotubuli nicht mehr ausüben kann und sich zu paarigen helikalen Filamenten zusammenlagert (Goedert *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1996). Diese bilden den Hauptbestandteil der Neurofibrillenbündel (NFT, *neurofibrillary tangles*). Das hyperphosphorylierte Tau-Protein findet man zudem auch im Zellkörper und in den Dendriten. Die Schädigung der Mikrotubuli führt letztendlich zum Absterben der Nervenzelle. Die Bildung der Fibrillen konnte bisher nicht mit der Ablagerung des Amyloid in Zusammenhang gebracht werden, weshalb einige Alzheimer-Forscher lange Zeit die Amyloid-Ablagerungen als Ursache der Alzheimer-Demenz angezweifelt haben.

Schließlich kann auch noch eine Degeneration der cholinergen Neuronen beobachtet werden. Diese sind für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin verantwortlich, der an der Signalweiterleitung in den Neuronen beteiligt ist (Abb. 1). Obwohl davon ausgegangen wird,

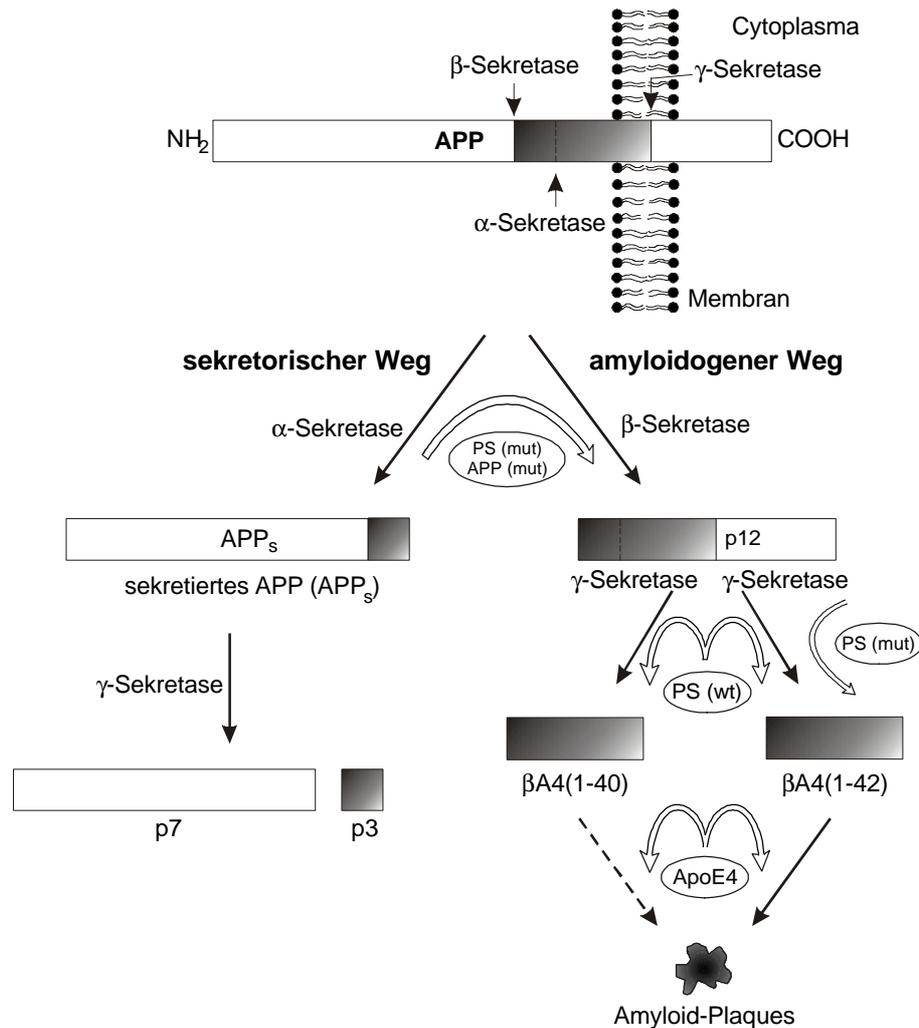
daß es sich hierbei nur um eine Folge der Krankheit nicht jedoch um deren Ursache handelt, setzen hier die ersten medikamentösen Therapien an, die in den letzten Jahren auf den Markt gekommen sind bzw. noch in der klinischen Phase getestet werden. Diese Medikamente hemmen entweder die Acetylcholinesterase, ein Enzym, das für den Abbau von Acetylcholin verantwortlich ist (Tacrin in Cognex<sup>®</sup>, Warner-Lambert; Donepezil in Aricept<sup>®</sup>, Eisai und Pfizer; Huperzine A, ein Alkaloid aus Kräutern der traditionellen chinesischen Medizin, Peruche & Schulz, 1998, Skolnick, 1997), aktivieren den Nikotin-Rezeptor, der für eine verstärkte Acetylcholinausschüttung sorgt, oder stimulieren den M1-Rezeptor, der normalerweise durch Acetylcholin aktiviert wird (Talsaclidin, Boehringer Ingelheim; Xanomelin, Eli Lilly; Miramelin, Hoechst, Mendla, 1996). Die ersten beiden Ansätze haben gegenüber den M1-Agonisten den Nachteil, daß sie auf eine gewisse Reaktivität der cholinergen Neuronen angewiesen sind. Sie können daher nur im frühen Krankheitsstadium eingesetzt werden. Durch Einsatz dieser Präparate wird es nicht möglich sein, die Krankheit zu stoppen, jedoch würde eine Verzögerung der Krankheit um 5 Jahre 50% der Patienten ein natürliches, würdevolles Lebensende ermöglichen, da die Krankheit meist erst im Alter auftritt (Marx, 1996a). Schätzungen zufolge leiden derzeit weltweit ca. 20 Millionen Patienten an Morbus Alzheimer. Allein in Deutschland wird von 1-1,2 Millionen Alzheimer-Erkrankten ausgegangen. Man rechnet mit weiter steigenden Zahlen infolge der wachsenden Population alter und sehr alter Menschen (Peruche & Schulz, 1998, Alzheimer Forschung International e. V., 1997). Die Entwicklung von Medikamenten ist deshalb auch aus gesundheitspolitischer und sozioökonomischer Sicht eine extrem wichtige Aufgabe. In den USA ist bereits jeder zweite Pflegefall ein Alzheimer-Patient.



**Abb. 1: Signaltransmission der cholinergen Neuronen.** Aus Acetyl-Coenzym A und Cholin entsteht in den cholinergen Neuronen mit Hilfe der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh). Für die Signalweiterleitung stimuliert ACh die M1-Rezeptoren der Synapsen. Im synaptischen Spalt wird ACh durch die Acetylcholinesterase (AChE) gespalten.

Nachdem 1984 das Amyloid ( $\beta$ A4) identifiziert wurde, stieg die Zahl der Veröffentlichungen über  $\beta$ A4 drastisch an. Das  $\beta$ A4 ist ein Peptid aus 39-43 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 4 kDa. 1987 konnte gezeigt werden, daß es ein Fragment des sogenannten Amyloid Vorläufer Proteins APP (*Amyloid Precursor Protein*) ist (Kang *et al.*, 1987, Dyrks *et al.*, 1988, Salbaum *et al.*, 1988). APP ist ein Transmembran-Glycoprotein, dessen Funktion bisher noch nicht bekannt ist. Es wird von drei unterschiedlichen Proteasen, den sogenannten  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen gespalten. Die  $\alpha$ -Sekretase zerschneidet das APP innerhalb der  $\beta$ A4-Sequenz (sekretorischer Weg) und verhindert dadurch die Bildung des unlöslichen Peptids (Esch *et al.*, 1990, Sisodia *et al.*, 1990, Anderson. J. P. *et al.*, 1991) (Abb. 2). Stattdessen entsteht ein APP-Fragment ( $APP_s$ ), das neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Mattson *et al.*, 1993). Schneiden jedoch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen das APP (amyloidogener Weg), entsteht das  $\beta$ A4, welches außerhalb der Zellen zu unlöslichen Plaques aggregiert (Haass *et al.*, 1992, Seubert *et al.*, 1992). Keine der Sekretasen konnte bisher identifiziert werden, jedoch lassen Inhibitionsstudien vermuten, daß die unterschiedlich langen Amyloide durch unterschiedliche  $\gamma$ -Sekretasen gebildet werden (Citron *et al.*, 1996). Auch die Funktion der Sekretasen im gesunden Gehirn ist bislang unbekannt.

Es wurde festgestellt, daß ein Teil der vererbaren Form der Alzheimer-Krankheit auf einen Gendefekt im APP-Gen auf Chromosom 21 zurückzuführen ist (Goate *et al.*, 1991). Diese Punktmutationen führen zu einer vermehrten APP-Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase und damit zu einer verstärkten  $\beta$ A4-Ablagerung (Suzuki *et al.*, 1994). Beim Down-Syndrom, bei dem das Chromosom 21 dreifach vorhanden ist und daher das APP stärker exprimiert wird, treten die gleichen Ablagerungen des  $\beta$ A4 auf (Glennner & Wong, 1984b). Auch bei anderen altersbedingten hirnschädigenden Erkrankungen, wie der Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington oder den Prionkrankheiten, wurden ähnliche Proteinablagerungen nachgewiesen. Dabei wird es immer offensichtlicher, daß sich die Aggregationsmechanismen ähneln (Lansbury, 1997). Während Mutationen im APP-Gen relativ selten auftreten, korrelieren die meisten erblichen Alzheimer-Fälle mit einer Mutation im Präsenilin-Gen 1 bzw. 2 (PS1 und PS2) auf Chromosom 14 bzw. 1 (Sherrington *et al.*, 1995, Levy-Lahad *et al.*, 1995). Defekte in diesen beiden Transmembranproteinen führen zu der aggressivsten Form der Alzheimer-Krankheit, die bereits im Alter von 45-52 Jahren auftritt.



**Abb. 2: Metabolismus des Amyloid Precursor Proteins (APP).** Das Transmembran-Protein APP wird entweder durch die  $\alpha$ -Sekretase unter Ausscheidung des neuroprotektiven APP<sub>s</sub> geschnitten oder aber durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase unter Ausscheidung des  $\beta$ A4s.

Bei allen drei Gendefekten wird der APP-Metabolismus so verändert, daß vermehrt  $\beta$ A4(1-42) entsteht, der extrem unlöslichen Amyloidform, die die Keime der senilen Plaques bildet (Jarett *et al.*, 1993). Das mengenmäßig überwiegende  $\beta$ A4(1-40) aggregiert langsamer, lagert sich aber bevorzugt an den bereits gebildeten Keimen des langen Amyloids ab und bildet so die eigentlichen Plaques (Asami-Odaka *et al.*, 1995). Die beiden Präseniline mit 467 bzw. 448 Aminosäuren (Haass, 1997) sind zu 67 % identisch und sind auch im Laufe der Evolution hochkonserviert geblieben. Sie konnten beim Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), in der Taufliege (*Drosophila*), im Krallenfrosch (*Xenopus*), im Zebrafisch und in Säugern nachgewiesen werden (Baumeister & Haass, 1998). Bei allen bekannten Mutationen, bis auf einer Ausnahme, handelt es sich um den Austausch einer Aminosäure, weshalb man vermutet, daß funktionelle oder strukturelle Defekte vom Organismus nicht toleriert werden.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Embryonensterblichkeit von Präsenilin-knock-out-Mäusen. Nur ein geringer Teil der Präseniline kann als vollständiges Protein isoliert werden, während überwiegend zwei Fragmente auftreten. Die proteolytische Spaltung scheint ein genau regulierter Prozeß zu sein. Unter den beteiligten Proteasen befinden sich auch welche aus der Caspase-Familie, den Proteasen, die am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt sind (Martinez *et al.*, 1995). Ein Zusammenhang zwischen der apoptotischen Proteolyse und der  $\beta$ A4-Prozessierung konnte jedoch nicht gezeigt werden (Brockhaus *et al.*, 1998).

Durch Zellversuche konnte bewiesen werden, daß für die Neurotoxizität der Amyloid-Plaques die Konformation des  $\beta$ A4 entscheidend ist (Pike *et al.*, 1991). Nur die faserigen Ablagerungen, nicht aber das lösliche  $\beta$ A4 oder die diffusen Ablagerungen sind cytotoxisch (Seilheimer *et al.*, 1997). Der Mechanismus, über den das Amyloid neurotoxisch wirkt, ist noch nicht bekannt. Einige Studien zeigen, daß Mikrogliazellen durch die Plaques aktiviert werden und eine Reihe reaktiver und cytotoxischer Stoffe ausschütten (Paresce *et al.*, 1996, Khoury *et al.*, 1996, Yan *et al.*, 1996). Während diese Aktivierung normalerweise nur vorübergehend ist, kommt es infolge der Amyloidablagerung zu einer dauerhaften Mikroglia-Aktivierung. Das führt zu chronischen Entzündungen, wodurch auch gesunde Neuronen geschädigt werden. Folglich helfen auch entzündungshemmende Medikamente wie z. B. Aspirin, Ibuprofen oder Naproxen bei Morbus Alzheimer und werden derzeit in klinischen Studien getestet (Marx, 1996a). Auch Apoptose wird mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht. Dabei wird vermutet, daß das  $\beta$ A4 durch Aktivierung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors den Zelltod auslöst (Yaar *et al.*, 1997). Da Neuronen im Gegensatz zu anderen Zellen nicht mehr nachwachsen, führt der Zelltod zwangsläufig zum Schrumpfen des Gehirns.

Lange Zeit konnten keine *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt werden, da kein Tiermodell vorhanden war. Deshalb existierten auch keine präklinischen Nachweise für die Wirksamkeit neuer Therapiestrategien. Nach mehreren Versuchen (Games *et al.*, 1995, Moran *et al.*, 1995, Higgins *et al.*, 1994) gelang es schließlich, ein mutiertes humanes APP-Gen der erblichen Form der Alzheimer-Demenz in das Genom einer Maus zu integrieren, so daß diese transgenen Mäuse mit zunehmenden Alter die meisten der charakteristischen neuropathologischen Veränderungen zeigten, die in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden werden (Marx, 1996b, Hsiao *et al.*, 1996). Diese Mäuse zeigten mit zunehmenden Alter sowohl senile Plaques als auch eine Lernschwäche und unterstützen daher die Amyloid-Hypothese. Von den Befürwortern der Tau-Protein-Hypothese wird das Modell jedoch in Frage gestellt, da es nicht die Veränderung des Tau-Proteins und die Bildung der

Neurofibrillenbündel im Gehirn der Mäuse aufweisen kann und damit eventuell nicht der typischen Pathologie der Krankheit beim Menschen entspricht. Andererseits wurden auch transgene Mäuse mit dem menschlichen Tau-Protein-Gen hergestellt. Diese produzierten daraufhin das Protein in einer phosphorylierten Form, die auch im Zellkörper, den Axonen und Dendriten auftrat. Die typischen Neurofibrillenbündel konnten jedoch nicht entdeckt werden (Götz *et al.*, 1995). Obwohl an der Entwicklung eines transgenen Alzheimer-Modell intensiv geforscht wird, existiert immer noch kein Modell, daß alle Symptome der Krankheit aufweist (Theuring *et al.*, 1997). Die derzeitigen Modelle sollten jedoch die Entwicklung von Medikamenten bereits erleichtern und beschleunigen.

Neben einer Therapie ist auch die frühzeitige Diagnose der Alzheimer-Krankheit von besonderem Interesse, da ein Abbau des Gehirns aller Voraussicht nach nur gestoppt, aber nicht mehr rückgängig gemacht werden kann. Bisher kann die Alzheimer-Krankheit nur durch Gespräche und Lerntests diagnostiziert werden, weshalb eine Therapie erst einsetzen kann, wenn sich die Demenz bereits bemerkbar gemacht hat, und der Abbau des Gehirns fortgeschritten ist. Es ist schon länger bekannt, daß APP nicht nur von Neuronen, sondern auch von Endothelzellen und Blutplättchen produziert wird (Selkoe *et al.*, 1988). Es existieren auch mehrere Studien, die vermuten lassen, daß diese APP-Produktion mit den  $\beta$ A4-Ablagerungen im Gehirn in Zusammenhang stehen (Ghilardi *et al.*, 1996, Shayo *et al.*, 1997). In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, daß sich das Verhältnis der unterschiedlichen APP-Isoformen aus Blutplättchen bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen verändert (Li *et al.*, 1995, Rosenberg *et al.*, 1997, Di Luca *et al.*, 1998). Da diese Veränderung bereits im frühen Stadium der Krankheit auftritt, hofft man, auf dieser Grundlage diagnostische Verfahren entwickeln zu können.

Da es sehr viele Argumente für die Amyloid-Hypothese gibt, wurden viele Untersuchungen zum Faltungsprozeß und zu den Entstehungsbedingungen der senilen Plaques durchgeführt. Ein Übergang der löslichen  $\alpha$ -Helix- oder Knäuelform in die unlösliche  $\beta$ -Faltblattstruktur wird vom carboxyterminalen Ende aus induziert. Folglich aggregieren  $\beta$ -Amyloide, die ein verkürztes C-terminales Ende besitzen, deutlich langsamer als z. B. das lange  $\beta$ A4(1-42) (Jarett *et al.*, 1993). Die Geschwindigkeit der Aggregation ist sowohl abhängig von der Konzentration des Peptids, als auch von der Salzkonzentration und des pH-Werts der Lösung (Burdick *et al.*, 1992, Barrow *et al.*, 1992, Garzon-Rodriguez *et al.*, 1997). Aluminium-, Zink- und Eisenionen beschleunigen die Aggregation um den Faktor 100-1000, weshalb man zeitweise die Krankheit auf eine Erhöhung der Aluminiumkonzentration in den Gehirnen der Patienten zurückgeführt hatte (Mantyh *et al.*, 1993). Diese Hypothese konnte jedoch nicht

bestätigt werden (McLachlan *et al.*, 1991). Bei einem pH-Wert von 5,5, in der Nähe des isoelektrischen Punkts des Peptids, ist die Tendenz zur Aggregation am größten, während der physiologische pH-Wert der Gewebeflüssigkeiten bei etwa 7,4 liegt (Barrow *et al.*, 1992). Weder eine Erniedrigung des pH-Wertes noch eine Veränderung der Elektrolytkonzentration gegenüber gesunden Menschen konnte bisher nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden sehr viele Erkenntnisse aus Versuchen gewonnen, die *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wurden, die den *in vivo*-Bedingungen nicht entsprechen und deshalb nur begrenzt übertragbar sind. So wurde festgestellt, daß die Konformation des chemisch synthetisierten Amyloids variiert und deshalb einige Experimente nicht reproduzierbar waren (Howlett *et al.*, 1995). Bevor dies erkannt wurde, arbeitete man überwiegend mit dem chemisch synthetisierten und lyophilisierten Amyloid. Erst neuerdings wird *in vivo*-synthetisiertes  $\beta$ A4 verwendet (Döbeli *et al.*, 1995).

Seit einigen Jahren existieren monoklonale Antikörper gegen  $\beta$ A4, die eine Quantifizierung des Amyloids ermöglichen. Auch der Nachweis von löslichem  $\beta$ A4 in verschiedenen Körperflüssigkeiten von Patienten und gesunden Menschen, gelang mit Hilfe dieser Antikörper. Anders als zuvor angenommen, existiert das  $\beta$ A4 nach der proteolytischen Spaltung in einer löslichen Form und aggregiert erst später zu den Plaques (Haass *et al.*, 1992, Seubert *et al.*, 1992, Shoji *et al.*, 1992). Da  $\beta$ A4 auch im Gehirn der Kontrollgruppen nachgewiesen werden kann, die Ablagerungen aber nicht in den Gehirnen gesunder Menschen entstehen, wurden Proteine postuliert, die entweder eine Aggregation beschleunigen, auch pathogene Chaperone genannt, oder das  $\beta$ A4 komplexieren und so an einer Aggregation hindern. Es konnten einige Proteine in der zerebrospinalen Flüssigkeit gefunden werden, die mit  $\beta$ A4 wechselwirken und in wesentlich höheren Konzentrationen auftreten. Zu diesen Proteinen gehört auch das ApoE, ein Lipoprotein, das am Cholesterintransport beteiligt ist. Es tritt in drei verschiedenen Isoformen auf. Während das ApoE3 die am weitesten verbreitete Form ist, erhöht ApoE4 das Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken und senkt das Alter des Auftretens der Demenz (Schmechel *et al.*, 1993, LaFerla *et al.*, 1997, Jonker *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu scheint ApoE2 das Risiko an der Alzheimer-Demenz zu erkranken zu verringern (Corder *et al.*, 1994). Ein anderes Protein, das mit  $\beta$ A4 Komplexe bildet und in hohen Konzentrationen in der zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommt, ist Transthyretin (TTR). Da das mit TTR komplexierte  $\beta$ A4 *in vitro* nicht zu Fibrillen aggregiert, könnte eine Mutation im TTR an der Fibrillenbildung und damit an der Alzheimer-Krankheit beteiligt sein (Schwarzman *et al.*, 1994).

Wenn  $\beta$ A4 Fibrillen bildet, die neurotoxisch wirken, dann sollte durch Inhibieren der Fibrillenbildung das Fortschreiten der Krankheit gestoppt werden können. Folglich ist die Pharmaindustrie sehr an der Entwicklung von Substanzen interessiert, die eine Aggregation des  $\beta$ A4 verhindern bzw. die bereits entstandenen Plaques wieder auflösen können. Rifampicin, ein weitverbreitetes Antibiotikum, das bei der Therapie von Tuberkulose und Lepra eingesetzt wird, ist ein solcher Stoff. Man ist auf ihn aufmerksam geworden, als auffiel, daß unter älteren Leprakranken nur sehr selten eine Demenz und senile Plaques zu beobachten sind (Namba *et al.*, 1992). Tomiyama *et al.* konnten zeigen, daß Rifampicin die Neurotoxizität von  $\beta$ A4(1-40), vermutlich durch Inhibition der  $\beta$ A4-Aggregation, *in vitro* verhindern kann (Tomiyama *et al.*, 1994). In einem anderen Ansatz wurden Antikörper gegen  $\beta$ A4 isoliert, die eine Fibrillenbildung *in vitro* verhindern (Solomon *et al.*, 1996). Daß monoklonale Antikörper, ähnlich wie Chaperone, Proteine in eine bestimmte Konformation falten können, wurde bereits beschrieben (Carlson & Yarmush, 1992, Blond & Goldberg, 1987). Durch die Analyse dieser Komplexbildung erhofft man Erkenntnisse zu gewinnen, die eine Entwicklung von Medikamenten ermöglichen.

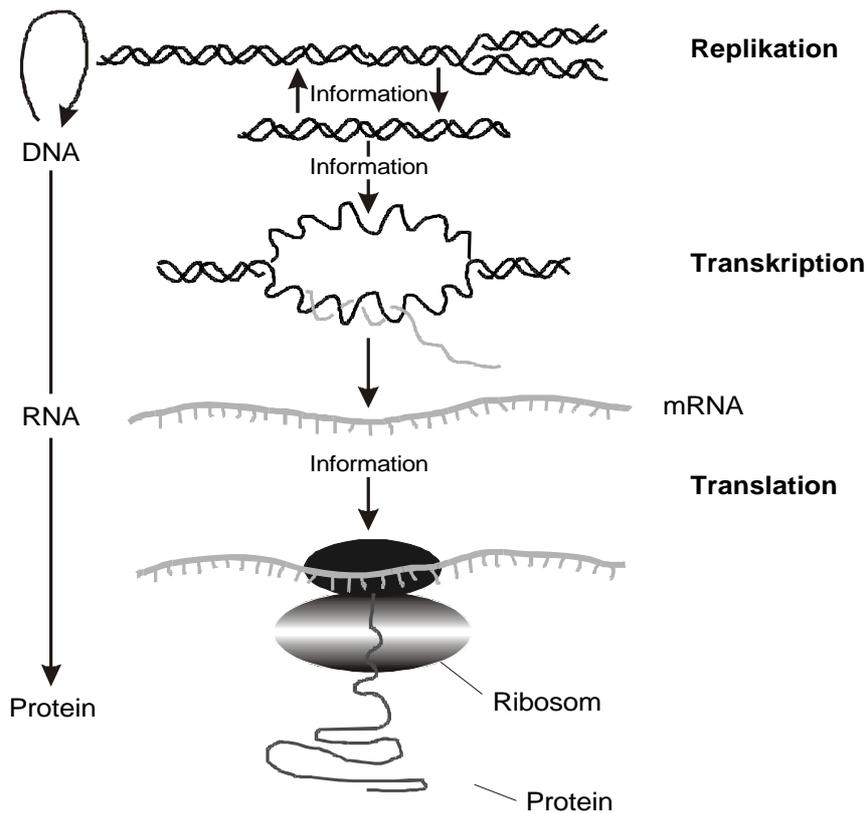
Ende 1997 konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß die APP-Prozessierung nicht wie angenommen erst an der Zelloberfläche, sondern bereits intrazellulär erfolgt. Außerdem wurde gezeigt, daß die proteolytische Spaltung des  $\beta$ A4(1-40) und  $\beta$ A4(1-42) durch die  $\gamma$ -Sekretasen in verschiedenen Kompartimenten der Zellen ausgeführt wird. Das Endoplasmatische Retikulum ist dabei das erste Kompartiment, in dem  $\beta$ A4(1-42) akkumuliert wird (Hartmann *et al.*, 1997, Cook *et al.*, 1997, Wild-Bode *et al.*, 1997). Die Präseniline sind ebenfalls hauptsächlich in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des frühen Golgi-Apparates lokalisiert und befinden sich somit in einer ausgezeichneten Position für die Kontrolle des Transports und/oder der Sortierung von APP. So konnte in Untersuchungen am Fadenwurm (*C. elegans*) gezeigt werden, daß das Präsenilin SPE-4 die Sortierung und den Transport von Proteinen zu spezialisierten Organellen kontrolliert (Hernault *et al.*, 1993). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Bindung von PS1 und PS2 an eine unreife Form von APP im Endoplasmatischen Retikulum (Weidemann *et al.*, 1997, Xia *et al.*, 1997). Diese Versuche konnten jedoch in anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Sisodia *et al.*, 1998). Daß die Prozessierung des APP sowohl zum  $\beta$ A4(1-40) als auch zum  $\beta$ A4(1-42) von den Präsenilinen abhängt, wurde durch Versuche mit PS1-knock-out-Mäusen bestätigt. Hierbei wurde die Amyloidproduktion um 80 % erniedrigt (De Strooper *et al.*, 1998). Mit diesen Erkenntnissen konnte die Bedeutung des  $\beta$ A4(1-42) und der Präseniline als zentrale Komponenten beim Entstehungsmechanismus der Alzheimer-Krankheit weiter etabliert werden.

## 1.2 RNA

Nukleinsäuren gehören mit den Proteinen und den Kohlenhydraten zu den wichtigsten makromolekularen Biomolekülen. Während die Proteine die Funktionen in der Zelle übernehmen, ist in allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen die genetische Information in Form von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) gespeichert. Das Bindeglied zwischen der genetischen Information und der Proteinbiosynthese stellt die RNA dar. Die Information der DNA wird in Form der messenger-RNA (mRNA) zu den Ribosomen transportiert, wo mit Hilfe der transfer-RNA (tRNA) die Proteine aufgebaut werden (Abb. 3). In den Ribosomen, die zu 2/3 aus der ribosomalen RNA (rRNA) bestehen, ist die rRNA ein essentieller struktureller und funktioneller Bestandteil. In einigen Viren (Retroviren), die ihre Erbinformation in Form von RNA speichern, verläuft der Informationsfluß teilweise umgekehrt. Während die Nukleinsäuren sowohl strukturelle als auch informelle Eigenschaften besitzen, sind Proteine lediglich strukturelle Einheiten, die keine Information weitergeben können.

1953 veröffentlichten Watson und Crick ihre ersten Entdeckungen zur Struktur der DNA. Mit dem Ansatzpunkt, daß das Verhältnis der Basen G zu C sowie A zu T immer gleich ist, schlugen sie die Basenpaarung über Wasserstoffbrücken und die Helixstruktur der DNA vor. Für diese Entdeckung erhielten sie 1962 den Nobelpreis.

In den sechziger Jahren, nachdem die Funktion der DNA und RNA bekannt war, wurde viel über den Ursprung des Lebens in einer frühen Phase der Evolution diskutiert. Die Frage, die sich stellte, war, ob die Nukleinsäuren oder die Proteine zuerst existierten, d. h. ob Nukleinsäuren ohne die Katalyse von Proteinen vervielfältigt werden konnten, oder ob Proteine ohne die Nukleinsäurematrix produziert wurden. Von mehreren Wissenschaftlern wurde postuliert, daß am Anfang RNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften existiert haben müssen, die ihre eigene Replikation steuern konnten (Woese, 1967, Crick, 1968, Orgel, 1968). Der Nachweis katalytischer Nukleinsäuren gelang allerdings erst 1982, als eine selbstpleißende RNA in *Tetrahymena thermophila* entdeckt wurde (Kruger *et al.*, 1982, Guerrier-Takada *et al.*, 1983).



**Abb. 3: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie.** Die Erbinformation der Zelle, die in Form der DNA vorliegt, kann durch Replikation vervielfältigt werden oder durch Transkription in mRNA übertragen werden. In den Ribosomen wird während der Translation die Information der mRNA mit Hilfe der tRNA zum Aufbau der Proteine genutzt. Diese stellen nur eine funktionelle Einheit dar, die keinen Informationsgehalt besitzen, der weitergegeben werden kann.

Obwohl die Existenz von Ribozymen (abgeleitet von *Ribonukleinsäure* und *Enzym*, Kruger *et al.*, 1982) bereits postuliert wurde, galt ihre Entdeckung als so bahnbrechend, daß Cech und Altman dafür 1989 einen Nobelpreis erhielten. Diese Entdeckung gab auch den Diskussionen um den Anfang des Lebens wieder neuen Auftrieb und der Begriff der „RNA-Welt“ wurde geprägt (Gilbert, 1986). 1993 wurden von Joyce und Orgel (Joyce & Orgel, 1993) die Merkmale, die bei allen Hypothesen übereinstimmten, in einer Definition zusammengefaßt. Diese besagt, daß in einer frühen Phase der Evolution die Erhaltung der genetischen Information ausschließlich auf einer Replikation von RNA beruhte, die ohne Proteine als Katalysatoren abgelaufen ist und für die eine Watson-Crick Basenpaarung essentiell war. Der Übergang von der RNA-Welt in die heutige von Proteinen dominierte Welt ist jedoch nach wie vor ungeklärt.

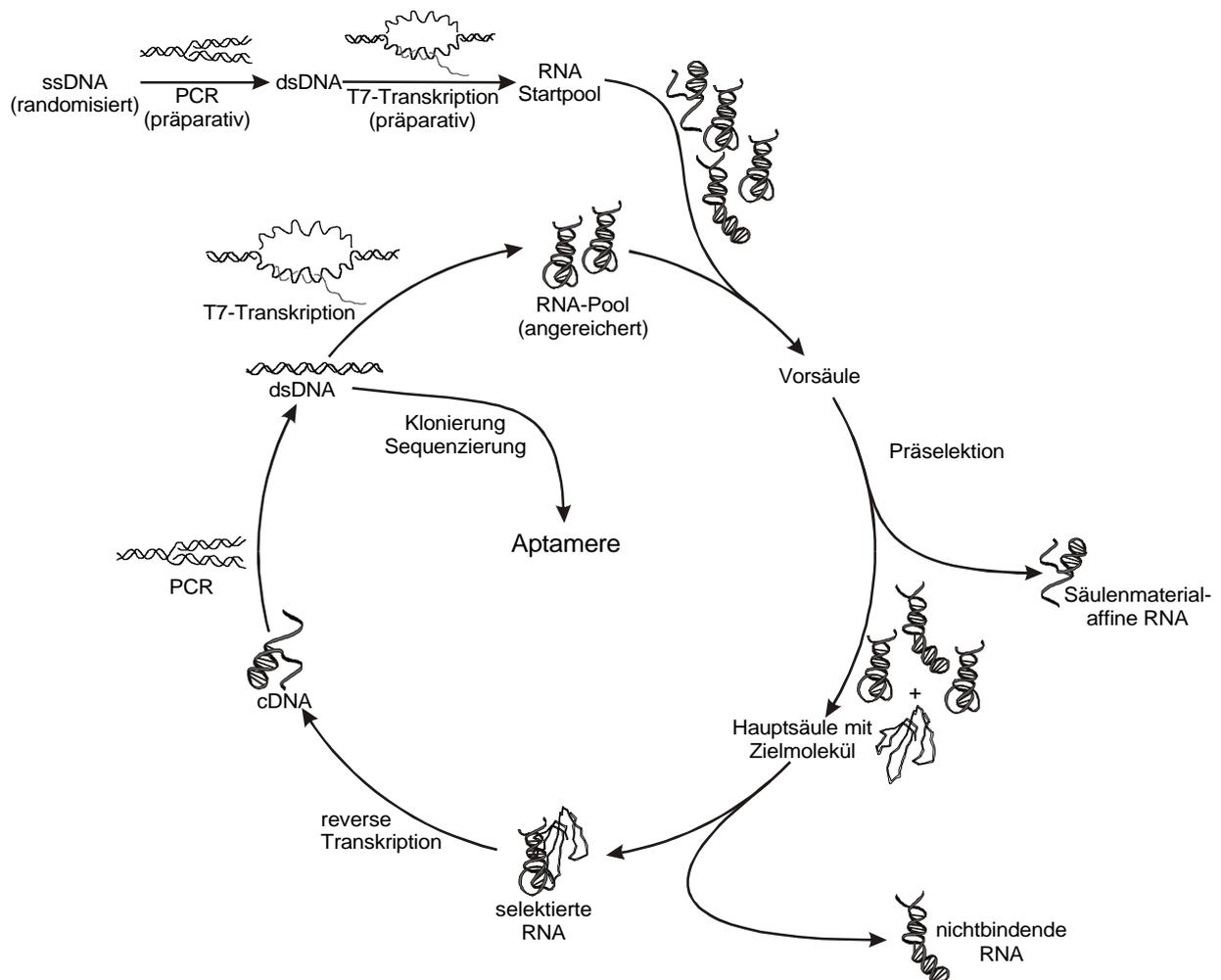
### 1.3 *In vitro*-Selektion

Nachdem durch die Existenz eines Ribozyms gezeigt wurde, daß RNAs nicht nur Informationsträger sind, sondern auch Makromoleküle mit einer definierten komplexen Struktur, entstand ein ganz neues Interesse an dieser Substanzklasse. 1989 beschrieb Joyce ein Evolutionsschema, mit dessen Hilfe neue katalytische RNAs selektiert werden sollten (Joyce, 1989). Im gleichen Jahr wurde erstmals das Prinzip der *in vitro*-Selektion angewendet. Aus genomischer DNA wurden Sequenzen isoliert, die den Transkriptionsfaktor TFIIIA binden können (Kinzler & Vogelstein, 1989). Unabhängig voneinander wurden 1990 von drei Arbeitsgruppen die Verfahren der *in vitro*-Selektion und *in vitro*-Evolution etabliert, bei denen erstmals mit partiell modifizierten oder vollständig synthetischen Bibliotheken gearbeitet wurde. Aus Strukturvarianten des *Tetrahymena* Ribozyms konnten Sequenzen selektiert werden, die in der Lage waren, anstelle von RNA einzelsträngige DNA zu spalten (Robertson & Joyce, 1990). Durch Variation von acht Nukleotiden innerhalb des Hairpins einer RNA, die an T4-DNA Polymerase bindet, konnte eine Variante identifiziert werden, die die gleichen Bindungseigenschaften besitzt wie die natürliche RNA (Tuerk & Gold, 1990). Außerdem wurden aus einer chemisch synthetisierten RNA-Bibliothek mit randomisierten Bereichen Moleküle selektiert, die verschiedene Farbstoffe erkennen konnten (Ellington & Szostak, 1990). RNA-Moleküle, die spezifisch an ein Zielmolekül binden, wurden Aptamere (lat. *aptus* passend) genannt. Für das *in vitro*-Selektionsverfahren wurde von Tuerk und Gold das Acronym SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) eingeführt.

Mit der *in vitro*-Selektion wurde ein elegantes Verfahren zur Gewinnung von Nukleinsäuren mit spezifischen Eigenschaften, den Aptameren oder Ribozymen, vorgestellt. Das Verfahren beruht, analog der natürlichen Evolution, auf einem zyklischen Prozeß aus Selektion und Amplifikation, der so oft wiederholt wird, bis die Nukleinsäuren die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Führt man in dem Amplifikationsschritt noch eine Veränderung des Pools ein, z. B. durch mutagene PCR, so spricht man von einer *in vitro*-Evolution. Als Ausgangspunkt für die Selektion wird eine Bibliothek aus möglichst vielen unterschiedlichen Molekülen benötigt. Diese kann man erhalten, indem man einen Bereich eines strukturell bekannten RNA-Moleküls variiert bzw. randomisiert. Man geht somit von einer bekannten stabilen Grundstruktur aus, die nur geringfügig verändert wird. Bei einer Variation von zehn Nukleotiden, kann so eine Bibliothek mit einer Komplexität von  $4^{10}$  ( $1 \cdot 10^6$ ) verschiedenen Molekülen generiert werden. Deutlich größere Bibliotheken werden durch chemische RNA-

Synthese erhalten, wobei man Regionen mit bis zu 120 randomisierten Nukleotiden herstellt. So ist eine theoretische Komplexität von bis zu  $4^{120}$  ( $1,8 \cdot 10^{72}$ ) verschiedenen Molekülen denkbar, von denen experimentell etwa  $10^{12}$ - $10^{18}$  erhalten werden können (Joyce, 1994).

Die Durchführung einer SELEX zur Gewinnung von RNA-Aptameren läßt sich in drei Abschnitte einteilen: die Konstruktion des Ausgangspools, die Selektion und Amplifikation und die Analyse der erhaltenen Aptamere (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schema zur *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren. Über mehrere enzymatische Schritte wird aus einer chemisch synthetisierten ssDNA-Bibliothek mit einem randomisierten Bereich ein RNA-Startpool für die Selektion erzeugt. Durch die zyklische Prozedur aus affinitätschromatographischer Selektion auf einer Säule und Amplifizierung der eluierten Moleküle werden affine RNA-Moleküle angereichert.

**Poolkonstruktion:**

Um eine Nukleinsäure-Bibliothek mit einer großen Komplexität zu erhalten, wird in den meisten Fällen von chemisch synthetisierten DNAs ausgegangen. Dazu wird mit Hilfe der automatischen Festphasensynthese eine randomisierte Sequenz synthetisiert, die von zwei konstanten Primerregionen von zumeist  $20 \pm 5$  Nukleotiden flankiert wird. Die Länge des randomisierten Bereichs wird dabei durch die Syntheseausbeute limitiert, die aufgrund von Abbruchreaktionen, Depurinierungen und fehlerhafter Entschützung mit zunehmender Länge sinkt. Die meisten Selektionen wurden mit randomisierten Bereichen zwischen 30 und 80 Nukleotiden durchgeführt. Die beiden flankierenden konstanten Regionen werden benötigt, um einzelsträngige DNA (ssDNA) mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zu Doppelstrang-DNA (dsDNA) zu komplettieren und zu vervielfältigen. Durch Einsatz von Primern, die über den Hybridisierungsbereich hinausragen, ist es möglich, die DNAs weiter zu verlängern. Dadurch kann der Erkennungsbereich für die T7-RNA-Polymerase, der T7-Promotor, eingeführt werden, der für die anschließende Transkription von DNA in RNA benötigt wird.

**Selektion und Amplifikation:**

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Möglichkeiten zur Durchführung der Selektion affiner RNA-Moleküle. In den meisten SELEX-Experimenten gegen Proteine wurde im Batch-Verfahren gearbeitet, d. h. die RNA wurde mit dem Zielmolekül zusammengegeben und der Komplex aus dem Protein und der affinen RNA durch anschließende Filtration über Nitrocellulosefilter von der nichtbindenden RNA abgetrennt. Bei Selektionen gegen kleinere Targetmoleküle, die nicht durch Filtration zurückgehalten werden können, wurde die Affinitätschromatographie verwendet, die auch schon bei der ersten Selektion gegen kleine Moleküle angewendet wurde. Bei der Affinitätschromatographie wird zusätzlich zum Säulenmaterial mit dem immobilisierten Zielmolekül auch noch gleichbehandeltes Säulenmaterial ohne Zielmolekül für eine Vorsäule hergestellt, um eine Anreicherung von Säulenmaterial-affinen RNA-Molekülen zu verhindern. Nachdem die RNAs in einem geeigneten Puffer renaturiert wurden, damit sie in einer reproduzierbaren Konformation vorliegen, werden sie über die Vorsäule auf die eigentliche Selektionssäule gegeben. Während der größte Teil der RNA von der Vor- und Hauptsäule heruntergewaschen wird, werden die RNA-Moleküle, die affin zum Säulenmaterial sind, auf der Vorsäule zurückgehalten und nur Moleküle, die an das Zielmolekül binden, verbleiben auf der Hauptsäule. Die Isolierung dieser Moleküle kann anschließend nach unterschiedlichen Strategien erfolgen. Die einfachste

Möglichkeit ist die Elution mit einem denaturierenden Puffer. Durch Denaturierung ändern die RNAs ihre Konformation und werden vom Zielmolekül abgelöst. Festbindende RNA-Moleküle in einer stabilen Konformation, die eigentlich besonders interessant wären, können dabei jedoch eventuell auf der Säule verbleiben, während unspezifisch bindende Moleküle miteluiert werden. Ein besserer Ansatz ist daher die Affinitätselution, bei der mit dem in Bindungspuffer gelöstem Zielmolekül eluiert wird (Sassanfar & Szostak, 1993). Dieses Verfahren benötigt jedoch große Mengen des Zielmoleküls und kann daher im Falle von Proteinen oder Peptiden recht kostspielig sein. Eine weitere Möglichkeit ist die reversible Immobilisierung des Zielmoleküls. So kann das Zielmolekül z. B. über eine freie Sulfidgruppe unter Ausbildung von Disulfidbrücken an das Säulenmaterial gekoppelt werden. Nachdem die affinen RNA-Moleküle an das Zielmolekül gebunden haben, werden die Disulfidbrücken reduktiv gespalten, so daß das Zielmolekül zusammen mit der RNA eluiert wird (Nieuwlandt *et al.*, 1995).

Die selektierte RNA wird bei der reversen Transkription in ssDNA umgeschrieben, die anschließend durch PCR vervielfältigt wird. Nach Transkription erhält man eine angereicherte RNA-Bibliothek für weitere Selektionsrunden. Wenn bei nachfolgenden Selektionsrunden der Anteil der eluierten RNA nicht mehr ansteigt, kann die SELEX abgebrochen werden. Während mit jedem Selektionszyklus die affinen Moleküle exponentiell angereichert werden, verringert sich die Komplexität in den meisten Selektionsexperimenten um einen Faktor von 100-1000. Theoretisch reduziert sich so die Komplexität des Startpools nach fünf Zyklen um den Faktor  $10^{10}$ - $10^{15}$ . Bibliotheken von  $10^{15}$  und mehr unterschiedlichen Molekülen lassen sich daher durch SELEX innerhalb kürzester Zeit, mit geringem Arbeitsaufwand und großer Effizienz nach Molekülen mit bestimmten Eigenschaften durchsuchen. In der Praxis werden bei einer Komplexität des Startpools von  $10^{15}$  unterschiedlichen Sequenzen in der Regel 6-15 Selektionsrunden benötigt, um die gewünschten Moleküle anzureichern. Für die Identifizierung der Aptamere werden die dsDNAs der letzten Runde in Plasmide ligiert, kloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen werden miteinander verglichen, um Gemeinsamkeiten in der Primär- und Sekundärstruktur und damit die Bindungsmotive zu identifizieren. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Bindungskonstanten. Es ist weiterhin möglich, eine *in vitro*-Evolution anzuschließen, um die Affinität der Aptamere zu erhöhen. Hierbei erzeugt man, analog zur Evolution, ein System aus Variation, Selektion und Amplifikation. Der Unterschied zur *in vitro*-Selektion besteht in der Variation, die man durch mutagene Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation durch PCR erreichen kann. Die Sequenzen der affinsten Aptamere werden also so oft verändert, bis keine weitere

Optimierung der Bindungseigenschaften mehr zu erreichen ist. Eine weitere Möglichkeit, hochaffine Aptamere zu gewinnen, ist die Erhöhung der Stringenz während der Selektionsrunden. Dies kann z. B. durch Erniedrigung der Beladung des Säulenmaterials mit dem Zielmolekül oder durch längeres Waschen mit dem Selektionspuffer erreicht werden. Ziel ist es, durch kompetitive Bedingungen während der Selektion die schwächerbindenden Sequenzen herausfallen zu lassen. Zu den Prinzipien der SELEX wurden bereits mathematische Berechnungen und Computersimulationen durchgeführt, um die besten Selektionsbedingungen zu bestimmen (Irvine *et al.*, 1991, Sun *et al.*, 1996).

### **Aptamere gegen kleine Moleküle**

Nach den grundlegenden Arbeiten aus dem Jahr 1990 (Tuerk & Gold, 1990, Ellington & Szostak, 1990, Robertson & Joyce, 1990), wurde die Methode der *in vitro*-Selektion vielfältig auf eine ganze Reihe unterschiedlicher Zielmoleküle angewendet. Während Gold *et al.* und Joyce *et al.* bei den ersten Selektionen von einem Pool mit einer konservierten Grundstruktur und nur einer relativ kleinen randomisierten Region ausgegangen sind, war die von Ellington und Szostak vorgestellte *in vitro*-Selektion gegen organische Farbstoffe die erste Selektion, bei der mit einer randomisierten Bibliothek ohne Strukturvorgaben gearbeitet wurde (Ellington & Szostak, 1990). Andere kleine Zielmoleküle, gegen die Aptamere selektiert wurden, sind z. B. verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika (Wang & Rando, 1995, Lato *et al.*, 1995, Wallis *et al.*, 1995, Famulok & Hüttenhofer, 1996), die Aminosäuren D-Tryptophan (Famulok & Szostak, 1992), L-Arginin (Connell *et al.*, 1993; Geiger *et al.*, 1996, Tao & Frankel, 1992), D-Arginin (Nolte *et al.*, 1996), L-Valin (Majerfeld, 1994) und L-Citrullin (Famulok, 1994). Das Aptamer gegen L-Citrullin konnte durch anschließende *in vitro*-Evolution in ein L-Arginin-Aptamer umgewandelt werden, wobei sich die beiden Aptamere nur in drei Nukleotiden des konservierten Bereichs unterscheiden. Es gibt eine Reihe weiterer Beispiele, die die hohe Spezifität von Aptamere wiedergeben. So wurden hochaffine RNA-Moleküle isoliert, die spezifisch den Flavinteil der biologischen Cofaktoren Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) erkennen können (Burgstaller & Famulok, 1994) oder eine unterschiedlich große Affinität zu Nicotinamiddinukleotid (NAD) und der reduzierten Form NADH aufweisen (Lauhon & Szostak, 1995). Das erste Experiment, bei dem die Fähigkeit des Aptamers zwischen zwei Molekülen zu unterscheiden gezielt entwickelt wurde, war die Selektion gegen Theophyllin (Jenison *et al.*, 1994). Jenison *et al.* gelang es, durch Gegenselektion (*counter selection*) mit einer Vorsäule mit einem ähnlichen, aber unerwünschten Molekül, alle Moleküle, die keine

genügend hohe Spezifität für das eigentliche Target aufweisen konnten, zu entfernen. So konnten sie Aptamere isolieren, die Theophyllin 1000-fach besser binden als das Derivat Coffein, das lediglich eine zusätzliche Methylgruppe enthält. Durch Waschen mit dem jeweiligen Enantiomer, konnten Klußmann und Nolte hochaffine RNAs gewinnen, die nur L-Adenosin und nicht das Enantiomer D-Adenosin erkennen (Klußmann *et al.*, 1996), bzw. solche, die zwischen D-Arginin und L-Arginin unterscheiden können (Nolte *et al.*, 1996).

### **Aptamere gegen Peptide und Proteine**

Schon bei den ersten *in vitro*-Selektionen zählte ein Protein zu den Zielmolekülen. Während damals noch von der natürlichen Grundstruktur einer an das Protein bindenden RNA ausgegangen und diese nur partiell randomisiert worden ist, wurde 1992 die erste Selektion mit einer vollständig randomisierten Nukleinsäure-Bibliothek gegen die HIV-1-Reverse Transkriptase vorgestellt (Tuerk *et al.*, 1992, Green *et al.*, 1995). Mit diesem Aptamer ist es möglich, die reverse Transkription der Virus-RNA zu inhibieren, wodurch eine Vermehrung des Virus verhindert wird. Andere Ansätze mit gleichem Ziel waren Selektionen gegen die HIV-1-Integrase (Allen *et al.*, 1995) und gegen einen Ausschnitt des Rev-Proteins (Xu & Ellington, 1996, Symensma *et al.*, 1996). Nachdem anfänglich nur nukleinsäurenbindende Proteine als Zielmoleküle dienten, folgten bald auch Proteine, die in ihrer physiologischen Umgebung nicht an Nukleinsäuren binden, wie z. B. Antikörper (Tsai *et al.*, 1992, Doudna *et al.*, 1995, Hamm, 1996) oder Thrombin (Bock *et al.*, 1992, Tasset *et al.*, 1997). Das Aptamer gegen Thrombin war das erste Aptamer, das in klinischen Studien getestet wurde. In weiteren pharmakologisch interessanten SELEX-Experimenten wurden Aptamere isoliert, die in den intrazellulären (Proteinkinase C, Conrad *et al.*, 1995) oder extrazellulären (*human nerve growth factor hNGF*, Binkley *et al.*, 1995) Signalweg der Zellen eingreifen. Weitere Zielmoleküle waren Wachstumsfaktoren (bFGF, Jellinek *et al.*, 1993, 1995, VEGF, Green *et al.*, 1995, KGF, Pagratis *et al.*, 1997), Elongationsfaktoren (EF-TU, Hornung *et al.*, 1998) und ribosomale Proteine. Die hierbei ermittelten Dissoziationskonstanten liegen in der gleichen Größenordnung wie die der natürlichen Bindungspartner.

Während kleine Peptide oft ungebunden in Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten auftreten und daher ein geeignetes Ziel für therapeutische Nukleinsäuren darstellen, war es lange Zeit ungewiß, ob aufgrund ihrer flexiblen Struktur eine Selektion von Aptameren gegen diese Substanzgruppe möglich ist (Rizo & Gierasch, 1992). Erst 1995 wurde, nach etlichen erfolgreichen Selektionen, ein Aptamer gegen den aus 11 Aminosäuren bestehenden Neurotransmitter *Substance P* vorgestellt (Nieuwlandt *et al.*, 1995). Es folgte die

Entwicklung eines Aptamers gegen ein Peptidfragment des HIV-1-Rev-Proteins (Xu & Ellington, 1996), gegen ein farnesyliertes Peptid (Gilbert *et al.*, 1997) und gegen ein Fragment aus einer konservierten Canyonregion des Rhinovirushüllproteins (De Beuckelar, 1998). Durch Blockierung dieser Region konnte eine Infektion der Zellen mit dem Virus verhindert werden. Aufgrund eingeschränkter Interaktionsmöglichkeiten sind die gefundenen Bindungskonstanten für die Peptide allerdings häufig schlechter als die von großen Proteinen (Gold *et al.*, 1995). Es wurden jedoch auch schon Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich gefunden (K *ras*-Peptid: 12 nM, Gilbert *et al.*, 1997).

Eine Selektion gegen Partikel vollständiger Viren wurde am Beispiel des Rous-Sarkoma-Virus vorgestellt (Pan *et al.*, 1995). Bereits geringe Konzentrationen hochaffiner RNA reichen aus, um den Virus zu neutralisieren und die Synthese viraler Proteine zu inhibieren. Pan *et al.* gehen davon aus, daß sich die Struktur der Virusoberfläche durch Bindung der Aptamere an die Hüllproteine des Virus verändert und dadurch eine Adsorption oder ein Verschmelzen mit der Wirtszelle nicht mehr erfolgen kann.

Neben den RNA-Aptameren sind mittlerweile auch eine ganze Reihe von ssDNA-Aptameren isoliert worden. Obwohl RNA eine Hydroxylgruppe mehr besitzt als DNA und daher stärker wechselwirken kann, liegen die Dissoziationskonstanten in der gleichen Größenordnung. Die gefundenen Aptamere unterscheiden sich jedoch in den Sequenzen und eine Transfer der RNA-Sequenz auf ein DNA-Aptamer führt nicht zu affinen Molekülen. Beispiele für DNA-Aptamere sind u. a. die Selektionen gegen organische Farbstoffe (Ellington & Szostak, 1992), Thrombin (Bock *et al.*, 1992, Griffin *et al.*, 1993, Macaya *et al.*, 1995), ATP (Huizenga & Szostak, 1995), Arginin (Harada & Frankel, 1995), HIV-1-Reverse Transkriptase (Schneider *et al.*, 1995) und menschliche neutrophile Elastase (Davis *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 1995).

### **Selektion von Ribozymen**

Die Existenz von Ribozymen in einer präbiotischen Welt wurde in den sechziger Jahren erstmals postuliert, konnte aber bis 1982 nicht belegt werden. Mit der Entdeckung eines RNA-spleißenden Ribozyms war das Interesse groß, durch Modifikation oder Selektion neue Ribozyme zu finden. Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Entwicklung eines neuen Ribozyms ebenfalls zu den ersten *in vitro*-Selektionsexperimenten gehörte. Während anfangs von Variationen bekannter Sequenzen ausgegangen wurde, um leicht abgewandelte Aufgaben zu lösen, wie z. B. die Spaltung von DNA anstelle von RNA durch Variation des Ribozyms aus *Tetrahymena* (Robertson & Joyce, 1990) oder vergleichbaren Experimenten mit dem

Hairpin-Ribozym (Berzal-Herranz *et al.*, 1992, 1993), dem Hepatitis Delta-Ribozym (Nishikawa *et al.*, 1996) und der RNase P (Pan & Zhong, 1994), wurden später auch völlig neue Ribozyme entwickelt. Die erste Selektion von Ribozymen, bei der von einem vollständig synthetischen RNA-Pool ausgegangen wurde, war die Entwicklung eines Ribozyms, das die 3'-Hydroxylgruppe an das eigene 5'-Triphosphatende ligieren kann. Es entspricht damit in der Wirkungsweise den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Bartel & Szostak, 1993). Andere Reaktionen, für die Ribozyme gefunden wurden, sind z. B. die Kinasierung (Lorsch & Szostak, 1994, 1995), Aminoacylierung (Illangsekere *et al.*, 1995), Alkylierung (Wilson & Szostak, 1995), Amidspaltung (Dai *et al.*, 1995, Joyce *et al.*, 1996) und Bildung von Amidbindungen (Wiegand *et al.*, 1997), Estertransferierung (Jenne & Famulok, 1998) oder die Nukleotidsynthese (Unrau & Bartel, 1998).

Bereits 1989 wurde ein Antikörper isoliert, der an ein Molekül bindet, das dem Übergangszustand einer Diels-Alder-Reaktion ähnelt und somit diese Reaktion katalysiert (Hilvert *et al.*, 1989). Die Überlegung hinter diesem Experiment ist, daß die beiden Reaktanden in einer dem Übergangszustand ähnlichen Form gebunden und dadurch einander angenähert werden wodurch die Aktivierungsenergie herabgesetzt wird. Analog zur Entwicklung der Abzyme, den katalytischen Antikörpern, wurden auch Aptamere gegen Übergangszustandsanaloge isoliert (Conn *et al.*, 1996; Li & Sen, 1996). Das erste Ribozym, das nach dieser Strategie gewonnen wurde, katalysierte die Isomerisierung eines verbrückten Biphenyls (Prudent *et al.*, 1994). Es wurden ebenfalls hochaffine RNAs gegen ein Diels-Alder-Übergangszustandsanalogon isoliert. Obwohl bei dieser Selektion 196 Aptamere untersucht wurden, konnten keine katalytisch aktiven RNAs erhalten werden (Morris *et al.*, 1994). Erst die Wahl eines anderen Selektionsansatzes ermöglichte die Entwicklung von Ribozymen für eine Diels-Alder-Reaktion (Tarasow *et al.*, 1997, Seelig & Jäschke, 1999).

Während in der Natur nur Beispiele für katalytische RNA-Moleküle bekannt sind, ist durch *in vitro*-Selektion auch die Isolierung von DNA-Enzymen gelungen. Obwohl bisher nur wenige Beispiele vorgestellt wurden (Faulhammer & Famulok, 1997, Geyer & Sen, 1997, Roth & Breaker, 1998), ist die katalytisch aktivste Nukleinsäure ein DNA-Enzym (Santoro & Joyce, 1997). An weiteren DNA-Enzymen wird gearbeitet, so daß bald neue Ergebnisse zu erwarten sind (Anderson, J. P. *et al.*, 1991).

Wichtige Zielsetzungen bei der Selektion von Ribozymen waren und sind die Entwicklung von pharmazeutisch interessanten Katalysatoren und die Unterstützung der Theorie für die Existenz einer RNA-Welt durch Aufzeigen des Potentials der RNA. Hierfür ist vor allem die

autokatalytische Synthese von RNA unabdingbar, da man davon ausgeht, daß die heute dafür existierenden Enzyme erst später entstanden sind. Durch die RNA-katalysierte Ligation einer 3'-Hydroxylgruppe mit einer 5'-Triphosphatgruppe (Bartel & Szostak, 1993) und der RNA-katalysierten Synthese von Nukleotiden aus einer Pyrimidinbase und einem Zuckerphosphat (Unrau & Bartel, 1998) ist man diesem Ziel deutlich näher gekommen. Präbiotische Synthesen für die Zucker (Mizuna & Weiss, 1974) und Zuckerphosphate (Pitsch *et al.*, 1995) sowie für die vier Basen (Oro, 1961, Sanchez *et al.*, 1967, Ferris *et al.*, 1968, Stoks & Schwartz, 1979, Robertson & Miller, 1995) wurden bereits beschrieben.

## 1.4 Stabilisierung von RNA

Durch die Entwicklung der *in vitro*-Selektion und *in vitro*-Evolution hat sich den Nucleinsäuren ein ganz neues Aufgabengebiet geöffnet. Ein großes Problem beim Einsatz von hochaffinen RNAs und Ribozymen ist ihre große Instabilität in physiologischen Flüssigkeiten aufgrund der weiten Verbreitung von RNasen. Dadurch schrumpft ihr Anwendungsgebiet auf nicht biologische Systeme und wird für die Arzneimittelforschung uninteressant. Um diesen Nachteil, vor allem monoklonalen Antikörpern gegenüber, zu beseitigen, wurde intensiv an der Modifikation von RNA geforscht, die ihre Stabilität unter physiologischen Bedingungen deutlich erhöht und damit die Entwicklung von Medikamenten, Diagnostika, und Sensoren auf RNA-Basis ermöglicht.

Bei den RNA-Modifikationen muß man zwei Ansätze unterscheiden: die nachträgliche Modifikation der Liganden und die Selektion mit modifizierter RNA. Der Vorteil der nachträglichen Modifikation ist die Durchführung der Selektion unter normalen Bedingungen sowie die Möglichkeit, bereits beschriebene Aptameren zu stabilisieren. So konnten bereits RNAs mit einer Halbwertszeit in biologischen Seren von mehreren Tagen hergestellt werden, während unmodifizierte RNA-Moleküle in Sekundenschnelle abgebaut werden. Die Modifikation einer RNA kann jedoch auch zu unerwünschten Veränderungen der Bindungseigenschaften führen. Daher sollten in der Regel nicht alle Nucleotide, sondern nur ausgewählte Stellen der RNA modifiziert werden. Umgehen läßt sich dieses Problem, indem man die Modifikationen schon im Ausgangspool einführt. Hierbei muß gewährleistet sein, daß die modifizierten Bausteine von den während der Selektion verwendeten Enzymen (DNA-, RNA-Polymerasen) toleriert werden, wodurch die Auswahl der Modifizierungen etwas eingeschränkt ist. Erfolgreich eingesetzt wurden 2'-Aminosubstituierte Cytidin- und Uridinbausteine in den Selektionen gegen die menschliche neutrophile Elastase (HNE, Lin *et*

*al.*, 1994), und den Wachstumsfaktoren bFGF (*basic fibroblast growth factor*, Jellinek *et al.*, 1995) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*, Green *et al.*, 1995). 2'-Fluor-2'-desoxypyrimidine wurden erstmals in der Selektion gegen den Rous Sarkoma Virus (Pan *et al.*, 1995) und später gegen das menschliches CD4-Glycoprotein (Davis *et al.*, 1998) verwendet. Pagratis *et al.* haben eine vergleichende Selektion mit 2'-Amino- bzw. 2'-Fluor-substituierten RNA-Bibliotheken gegen den Wachstumsfaktor KGF (*keratinocyte growth factor*, Pagratis *et al.*, 1997) durchgeführt. Dabei haben sie festgestellt, daß die Fluor-substituierten Aptamere aufgrund höherer Elektronegativität rigidere Strukturen ausbilden, die bessere Bindungseigenschaften besitzen. So konnte in dieser Selektion Aptamere mit den kleinsten Dissoziationskonstanten von lediglich 0,3-3 pM isoliert werden, während eine Selektion mit aminosubstituierten RNAs in Aptameren mit einer Dissoziationskonstante von 400 pM resultierte. Auch eine Kombination aus prä- und postselektiven Modifikationen ist möglich, um zu einer erhöhten Stabilität zu gelangen (Green *et al.*, 1995). Weitere Modifikationen an der 2'-Position sind Substitutionen der Hydroxylgruppe gegen eine Methoxy- oder Allylgruppe. Durch terminalen Einbau von Phosphorthioaten oder 3'-3'-Verknüpfungen kann die Stabilität gegenüber Exonukleasen erhöht werden (Heidenreich *et al.*, 1994, Beigelman *et al.*, 1995). Ein anderer Ansatz ist die Selektion von Aptameren gegen das Enantiomer des Zielmoleküls. Die spiegelbildliche RNA, das sogenannte Spiegelmer, bindet dann das eigentliche Zielmolekül, kann aber, als in der Natur nicht auftretendes Molekül, von den Enzymen nicht erkannt und daher nicht abgebaut werden (Klußmann *et al.*, 1996, Nolte *et al.*, 1996). Diese Methode führt zu sehr stabilen Liganden, läßt sich jedoch nur auf Zielmoleküle anwenden, die nicht chiral sind oder bei denen das Enantiomer zugänglich ist.

## 1.5 Vergleich von Aptameren und Antikörpern

Seit den ersten *in vitro*-Selektionen von 1990 sind große Fortschritte erzielt worden, die heute die Isolierung von stabilen, hochaffinen Liganden gegen fast jedes Zielmolekül ermöglichen. Zu den bereits weitverbreiteten Antikörpern für die molekulare Erkennung ist somit eine neue Stoffklasse mit anderen Eigenschaften dazugekommen. Ein großer Unterschied ist die Isolierung der affinen Moleküle, die bei den Antikörpern *in vivo* durchgeführt werden muß, wofür Tiere oder Zelllinien benötigt werden, während die Isolierung der Aptamere *in vitro* erfolgt, weshalb auch keine *in vivo*-Variationen auftreten können. Dadurch ist auch die Entwicklung von Aptameren gegen Toxine oder wenig immunogenen Substanzen möglich.

Durch Gegenselektion können gezielt Aptamere erzeugt werden, die zwischen zwei sehr ähnlichen Molekülen unterscheiden können. Aptamere können chemisch synthetisiert werden, wodurch eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet ist. Auch der Einbau von Reportermolekülen an genau definierter Position wird durch die chemische Synthese erleichtert. Weiterhin sind Nukleinsäuren leichter zu handhaben, da sie im Gegensatz zu Proteinen reversibel durch Hitze denaturiert werden können. Proteine falten sich beim Abkühlen nicht so einfach wieder in ihre aktive Konformation zurück. Nachteilig ist die große Empfindlichkeit der RNAs gegenüber Nukleasen in biologischen Flüssigkeiten, weshalb sie anfangs einen sehr limitierten Einsatzbereich hatten. Durch Fortschritte bei der Modifizierung von RNA konnte die Stabilität deutlich erhöht werden, weshalb Aptamere jetzt für therapeutische und diagnostische Anwendungen höchst interessant werden.

Die Pharmaindustrie ist ebenfalls stark in der *in vitro*-Selektion involviert, insbesondere durch kleinere Firmen, die sich auf dieses Gebiet spezialisiert haben, wie z. B. NeXstar Pharmaceuticals, Ribozyme Pharmaceuticals, Gilead Sciences, Immusol Inc., Noxxon Pharma AG u. a., die zum Teil erst vor wenigen Jahren gegründet wurden. Neben hochaffinen RNAs sind vor allem Ribozyme, die mRNA sequenzspezifisch spalten können und so z. B. die Synthese viraler Proteine verhindern, von großem Interesse. Derzeit sind zwei Ribozyme für eine Ribozym-Gen-Therapie gegen HIV und ein weiteres für eine Krebstherapie in der klinischen Phase, doch weitere gegen Hepatitis B und C werden voraussichtlich folgen (Persidis, 1997, Ribozyme Pharmaceuticals, 1998). Obwohl noch kein Aptamer bzw. Ribozym auf den Markt gekommen ist, und sich derzeit auch nur ein Aptamer von NeXstar gegen den Wachstumsfaktor VEGF in der klinischen Phase befindet, werden in Zukunft sicherlich weitere entwickelt werden.