

5 Diskussion

Obwohl seit etwa 15 Jahren mit großem Interesse an der Alzheimer-Demenz geforscht wird, ist die Ursache der Krankheit weiterhin unbekannt. Auch eine Diagnose der Krankheit ist bis heute nur durch Gespräche mit den Patienten und deren Angehörigen möglich. Obwohl die ersten Medikamente jetzt auf den Markt kommen, ist eine Heilung der Krankheit noch nicht in Sicht. Ein Grund, warum trotz intensiver Forschung der medizinische Fortschritt noch relativ klein ist, liegt im Fehlen eines Modells für diese Krankheit. Es ist bisher noch nicht gelungen, die Krankheit auf ein Versuchstier zu übertragen. Sehr viele Experimente werden daher *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt, die nicht den sehr komplexen *in vivo*-Bedingungen im Gehirn entsprechen.

Da die ersten Medikamente auf dem Markt die Krankheit lediglich verzögern oder bestenfalls stoppen können, nicht jedoch den Abbau des Gehirns rückgängig machen können, ist eine frühzeitige Diagnose der Krankheit von extremer Bedeutung. Ein Molekül, das nach allgemeiner Meinung mit der Krankheit in Verbindung steht, ist das β A4. Es tritt im Gehirn der Patienten in Form unlöslicher Plaques auf und kann auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Derzeit suchen viele Pharmakonzerne nach Molekülen, die diese Plaques auflösen vermögen bzw. deren Bildung verhindern können, bisher jedoch ohne größeren Erfolg. Ein interessanter Ansatz war die Gewinnung von Antikörpern, die eine Faltung in die unlösliche β -Faltblattstruktur verhindern können. Eine Stoffklasse, die bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht wurde, sind die Nukleinsäuren. Die *in vitro*-Selektion bietet eine einfache Methode, um aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Moleküle hochaffine RNAs gegen ein bestimmtes Zielmolekül zu isolieren. Ähnlich wie die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern durch Phage-Display wird für das Verfahren der *in vitro*-Selektion keine Kenntnis der Struktur des Zielmoleküls benötigt. In dieser Arbeit wurde diese RNA-Technologie zur Untersuchung der Alzheimerschen Krankheit angewendet, indem hochspezifische RNA-Moleküle für das β A4-Amyloid (β A4(1-40)) und ein Amyloidfragment aus 16 Aminosäuren (β A4(1-16)) isoliert wurden.

***In vitro*-Selektion**

Die RNA-Bibliothek für die Selektion wurde durch enzymatische Transkription aus einer chemisch synthetisierten DNA-Bibliothek hergestellt. Dazu wurde eine Einzelstrang-DNA

mit einem randomisierten Bereich von 70 Basen synthetisiert, die durch PCR zum Doppelstrang komplettiert und vervielfältigt wurde. Je länger der randomisierte Bereich ist, desto größer ist die Strukturvielfalt in der entstehenden Bibliothek. Allerdings sinken die Synthesausbeuten mit zunehmender Länge der DNA, weshalb die Länge auf 70 Nukleotide beschränkt wurde. Bei der Bestimmung der Komplexität muß beachtet werden, daß je nach Qualität der Synthese neben kürzeren Abbruchprodukten auch unvollständig entschützte oder depurinierte Oligonukleotide entstehen können, die nicht durch die Enzyme vervielfältigt werden können. Weiterhin können auch Sequenzen mit sehr stabilen Sekundärstrukturen auftreten, die ebenfalls nicht von den Enzymen toleriert werden. Daher wurde für die Bestimmung der Poolkomplexität nur die durch PCR amplifizierbare DNA betrachtet, wodurch eine Bibliothek mit einer Komplexität aus 10^{15} Molekülen resultierte. Sowohl die Länge des randomisierten Bereichs als auch die Komplexität des Pools liegen in einer Größenordnung, wie sie in der Literatur für Selektionen gegen Peptide beschrieben wurde (Nieuwlandt *et al.*, 1995, Xu & Ellington, 1996, De Beuckelar, 1998).

Die Selektion wurde affinitätschromatographisch durchgeführt, wobei das Zielmolekül reversibel immobilisiert wurde, so daß durch Abspaltung des Zielmoleküls die affinen RNA-Moleküle im Komplex mit dem Peptid eluiert werden konnten. Nach 8 Zyklen wurde die Selektion bei beiden Peptiden beendet, nachdem 20 % des angereicherten Pools beim β A4(1-40) bzw. 17 % beim β A4(1-16) spezifisch eluiert wurden. Die Tatsache, daß der Anteil der an das Peptid-bindenden RNA in folgenden Selektionsrunden nicht weiter gestiegen ist, läßt sich vermutlich auf eine fehlerhafte Konformation der Moleküle zurückführen und ist auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Selektionen in dieser Größenordnung vorzufinden (Nieuwlandt *et al.*, 1995, De Beuckelar, 1998).

Charakterisierung der Aptamere

Die Primärstrukturen von 75 Aptameren beider Selektionen wurden durch Klonierung und Sequenzierung bestimmt. Die Sequenzen lassen sich in Gruppen einteilen, die in hohem Maße konserviert sind. Durch Vergleich der Sequenzen konnte unter den Aptameren gegen das Amyloid ein Motiv aus bis zu 11 Nukleotiden gefunden werden, das in 83 % der Sequenzen auftritt. Ein weiteres Motiv taucht in 75 % der Sequenzen auf. Die Wahrscheinlichkeit, daß nur zwei Moleküle in einem Pool von Sequenzen mit 70 randomisierten Positionen zufällig identische Sequenzabschnitte von 11 zusammenhängenden Positionen aufweisen, ist nahezu null. Bei den Aptameren gegen das Amyloidfragment wurde ein Motiv aus neun Basen in über der Hälfte der Sequenzen gefunden. Auch hier existieren weitere Sequenzgruppen mit konservierten Motiven.

Die Sekundärstrukturmodelle einzelner Aptamere für das Amyloid zeigten innerhalb der Gruppen nur geringe Unterschiede. Der Vergleich der RNAs unterschiedlicher Gruppen läßt Rückschlüsse auf an der Bindung an das Peptid beteiligte Bereiche zu. So tritt bei einem Motiv bei allen Sequenzen eine Basenpaarung mit dem Primer A auf, überwiegend unter Bildung eines Loops mit vier einzelsträngigen Pyrimidinbasen. Es konnten weitere ungepaarte Basen identifiziert werden, die in einem Großteil der Sequenzen anzutreffen sind. Die Analyse der Modelle läßt vermuten, daß eine Verkürzung der Aptamere am 3'-Ende möglich wäre.

Die apparenten Dissoziationskonstanten der Aptamere wurden durch Affinitätschromatographie bestimmt. Für die Aptamere gegen das β A4(1-40) wurden dabei Dissoziationskonstanten zwischen 29 und 48 nM erhalten, während die für das β A4(1-16) lediglich bei 758 nM lagen. Damit wurden sehr gute Aptamere gegen das Amyloid isoliert, die mit den besten Aptameren für Peptide zu vergleichen sind, während die Bindungskonstanten für das β A4(1-16) immer noch in einem für Peptide akzeptablen Bereich liegen. Im Vergleich dazu wurden bisher für Aptamere gegen Peptide Dissoziationskonstanten von 11-21 μ M für Viomycin (Wallis *et al.*, 1997), 6-16 μ M für ein Fragment aus dem Hüllprotein des Rhinovirus (De Beuckelar, 1998), 190 nM für den Neurotransmitter Substance P (Nieuwlandt *et al.*, 1995), 19-36 nM für einen Ausschnitt des HIV-1-Rev-Proteins (Xu & Ellington, 1996) und 12 nM für ein farnesyliertes K *ras*-Peptid (Hornung *et al.*, 1998) erzielt. Eine Ursache für den großen Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten für das β A4(1-40) und β A4(1-16) könnte eine unterschiedlich große Stringenz bei den Selektionen gewesen sein. Obwohl beide Selektionen nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wurden, war die Beladung des Säulenmaterials im Fall der β A4(1-16)-Selektion um den Faktor 10 größer als die der β A4(1-40)-Selektion. Bei gleich großen Waschschrritten ist damit der Selektionsdruck bei der β A4(1-40)-Selektion deutlich größer gewesen.

Andererseits wird beobachtet, daß die Affinitäten von Aptameren zu kleinen Molekülen oder kleinen flexiblen Peptiden häufig kleiner sind als zu Proteinen. Ein Grund dafür könnte die kleinere Oberfläche dieser Moleküle sein, die für die Interaktion mit den Aptamer zur Verfügung steht (Gold *et al.*, 1995). Damit ein stabiler Komplex gebildet wird, muß der Energiegewinn der Komplexbildung den Entropieverlust kompensieren. Der Energiegewinn ergibt sich aber aus der Interaktion von der RNA mit der Oberfläche von dem Target. Der Entropieverlust bei der Komplexbildung dagegen ist bei einem kleinen flexiblen Peptid größer als bei einem Protein mit einer vergleichsweise starren Konformation.

Ein Problem bei der Durchführung von Selektionen gegen biologisch aktive Makromoleküle ist die Gewährleistung der aktiven Konformation. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Schering AG chemisch synthetisiert, über HPLC aufgereinigt und lyophilisiert. Während der Durchführung dieser Arbeit wurde herausgefunden, daß die Konformation des chemisch synthetisierten β A4(1-40) von Synthese zu Synthese variieren kann und nicht immer mit der biologisch aktiven Form übereinstimmt. Daher arbeitet man heute mit *in vitro*-synthetisiertem Amyloid, das über HPLC aufgereinigt wird und ohne Lyophilisieren direkt nach der HPLC in 20 % Acetonitril tiefgefroren wird. Die Bestimmung der Konformation des Amyloids gegen die Aptamere gewonnen wurden, ist folglich von großem Interesse, jedoch ist eine Strukturbestimmung des Peptids auf dem Säulenmaterial nicht ohne weiteres möglich. Da das Amyloid fibrillenförmige Aggregate bildet, die unter einem Elektronenmikroskop beobachtet werden können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft das Säulenmaterial unter dem Elektronenmikroskop auf Amyloidfibrillen untersucht. Aufgrund mangelnden Kontrasts auf der Oberfläche des Säulenmaterials konnten jedoch keine Amyloidfibrillen entdeckt werden.

Es wurden unterschiedliche Versuche unternommen, eine Bindung der Aptamere an das lösliche Amyloid nachzuweisen. Obwohl diese Versuche erfolglos waren, kann eine Bindung an die lösliche Form des Amyloids weiterhin nicht ausgeschlossen werden. So ist eine Dissoziation des Komplexes auf einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld möglich, zumal auch mit einem gegenüber der Selektion veränderten Puffer gearbeitet werden mußte, da der Bindungspuffer eine zu hohe Natriumchloridkonzentration enthält. Auch die kompetitive Elution mit freiem Peptid von einer Affinitätssäule war nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür könnte jedoch auch eine Aggregatbildung des freien Peptids in der Umgebung der Matrix sein, wie sie von Nieuwlandt *et al.* bereits bei der Selektion gegen *Substance P* vermutet wurde (Nieuwlandt *et al.*, 1995). Die am häufigsten verwendete Methode für die Bestimmung von Bindungskonstanten von Aptameren, die Gleichgewichtsdialyse, konnte nicht verwendet werden, da hierfür ein radioaktiv markiertes Peptid benötigt wird. Nach einer chemischen Markierung hätte das Peptid wieder aufgereinigt werden müssen, wodurch eine Konformationsänderung nicht ausgeschlossen werden kann.

Es sollten weitere Bindungsstudien mit Amyloid unterschiedlicher Konformation z. B. fibrillenartig aggregiertes oder mit diffusen Plaques durchgeführt werden, um herauszufinden, welche Konformation von den Aptameren erkannt wird. Weiterhin soll untersucht werden, welchen Einfluß die Aptamere auf die Aggregation des löslichen Amyloids bzw. die Neurotoxizität der Amyloid-Plaques haben.

Etwas überraschend ist die Beobachtung, daß bei der Selektion gegen das kurze β A4(1-16) nur eine bindende Sequenz gefunden werden konnte, während einige Sequenzen gar keine Spezifität aufwiesen. Vermutlich hätten weitere bindende Aptamere gefunden werden können, jedoch war bei dieser Untersuchung das Trägermaterial mit dem immobilisierten Peptid die limitierende Größe, weshalb die Dissoziationskonstanten nur von wenigen Sequenzen bestimmt werden konnten.

Stabilität der Aptamere

Aufgrund der erhaltenen Dissoziationskonstante sollte eine weitere Anwendung dieser Aptamere als Sonde für die Funktionsanalyse bzw. für neue Diagnostika möglich sein. Es wurden bereits Antikörper beschrieben, die eine Aggregation des β A4 inhibieren und damit die Bildung der neurotoxischen Plaques verhindern können. Aptamere haben gegenüber Antikörpern einige Vorteile. Im Gegensatz zu den Antikörpern können sie chemisch in großer Reinheit hergestellt werden. Die chemische Synthese ermöglicht auch die gezielte Einführung von Modifikationen, insbesondere von Reportermolekülen, wodurch ein Einsatz in der Diagnostik deutlich vereinfacht werden kann. So wurden auf Basis von Aptameren auch bereits Biosensoren (Kleinjung *et al.*, 1998) und Hilfsmittel für die Fluß-Cytometrie (Davis *et al.*, 1996, 1998) vorgestellt. Auch Kombinationen von RNAs und Antikörpern, z. B. für Western Blots oder ELISA-Tests, wurden schon beschrieben (Drolet *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 1996). Ein weiterer Vorteil ist die Renaturierbarkeit der Nukleinsäuren, wogegen Proteine nicht oder nur teilweise zu renaturieren sind. Dadurch sind die RNAs deutlich stabiler.

Ein Problem beim Arbeiten mit RNA ist jedoch der schnelle nukleolytische Abbau in Gegenwart von RNasen. Während man im Labor durch sauberes Arbeiten eine Kontamination mit RNasen vermeiden kann, läßt sich der Kontakt mit RNasen bei vielen Anwendungen, vor allem im medizinischen Bereich, nicht vermeiden. Um dennoch RNA-Aptamere in diesen Bereichen einsetzen zu können, wurden verschiedene Modifikationen der RNA entwickelt, die ein Angreifen der RNasen verhindern oder zeitlich deutlich verzögern. Dabei unterscheidet man zwischen Modifikationen, die nach abgeschlossener Selektion an dem RNA-Aptamer durchgeführt werden und Modifikationen, die von Anfang an vor der Selektion durchgeführt werden. Während die Modifikationen des fertigen Aptamers die Bindungseigenschaften ändern können und die Modifikationsstellen daher gut ausgesucht werden müssen, ist bei der Methode der Modifikation des Pools entscheidend, daß die Enzyme für die Transkription und reverse Transkription die modifizierte RNA synthetisieren bzw. lesen können. Eine mögliche Modifikation ist z. B. die Substitution der 2'-Hydroxyl-

gruppe des Zuckers gegen ein Fluorid, eine Amino- oder eine Methoxygruppe in den Pyrimidinnukleotiden. Diese Nukleotide werden während der Transkription in die RNA eingebaut und können auch von der reversen Transkriptase wiedererkannt werden. Eine Möglichkeit für die Modifikation fertiger Aptamere ist der terminale Einbau von Thiophosphatnukleotiden. Hierbei wird ein Sauerstoff der Phosphatgruppe gegen ein Schwefelatom ausgetauscht. Auch eine 2'-5'- oder endständige 3'-3'-Verknüpfung erhöht die Halbwertszeit bei Anwesenheit von RNasen deutlich.

Eine dritte Möglichkeit, RNase-stabile Liganden zu erhalten, ist die Synthese von Spiegelmeren. Dazu wird die Selektion gegen das Spiegelbild des Targets durchgeführt. Die spiegelbildlichen RNAs, Spiegelmere genannt, erkennen dann das eigentliche Target, können aber, da es unnatürliche Moleküle sind, von RNasen nicht angegriffen werden. Der Nachteil dieser neuen Methode ist, daß das Spiegelbild des Zielmoleküls benötigt wird. Dadurch ist diese Methode nur auf Selektionen anwendbar, bei denen man das Enantiomer des Zielmoleküls erhalten kann. Im Falle des Amyloids ist das Enantiomer zugänglich und mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, das Aptamere gegen dieses Peptid isoliert werden können. Daher sollte auch die Entwicklung von Spiegelmeren gegen Amyloid möglich sein.

Ausblick

Es ist bisher nur selten möglich, zielgerichtet ein Medikament zu synthetisieren. In der Regel müssen sehr viele Verbindungen untersucht werden, bevor man ein wirksames Molekül auffinden kann. Daher verwundert es nicht, daß die Gewinnung neuer Medikamente durch kombinatorische Bibliotheken zunehmend an Bedeutung gewinnt, ermöglicht sie doch den kostengünstigen Zugang zu einer großen Anzahl unterschiedlicher Moleküle. Bisher galt das Augenmerk der pharmazeutischen Industrie bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe neben kleinen Molekülen mehr den Proteinen als den Nucleinsäuren. Die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte in der Synthese und Strukturaufklärung von Nucleinsäuren zeigen allerdings das enorme Potential dieser Stoffklasse. Das besondere dieser Stoffklasse gegenüber allen anderen ist, daß sie Genotyp und Phänotyp in einem Molekül vereinen, wodurch eine Vervielfältigung der erwünschten Moleküle möglich ist. Diese Tatsache hat man sich bei der *in vitro*-Selektion zunutze gemacht, um hochspezifische Aptamere oder Ribozyme zu selektieren. Die automatisierte Synthese mit einem Nucleotidmix erlaubt die Herstellung von Bibliotheken mit einer Komplexität von 10^{15} und mehr unterschiedlicher Moleküle, eine Zahl, die durch klassische organische Synthese nicht erreicht werden kann. Durch Modifikationen können stabile RNA-Moleküle erzeugt werden, die ausreichend lange

Halbwertszeiten auch bei Anwesenheit von RNasen aufweisen. Es ist zu erwarten, daß es nicht mehr lange dauern wird, bis die ersten Wirkstoffe oder Diagnostika auf Nukleinsäurebasis auf den Markt kommen werden.

Die in dieser Arbeit isolierten Aptamere sollen als Hilfsmittel bei der Suche nach der Ursache der Alzheimerschen Krankheit dienen oder sogar eine Entwicklung von Diagnostika ermöglichen. Aufgrund der Dissoziationskonstanten erscheint eine Verkürzung der Aptamere als lohnenswert, vor allem im Hinblick auf eine spätere chemische Synthese. Die Analyse der Sekundärstrukturen ergab hierfür bereits Ansatzpunkte. Das große Potential dieser RNAs liegt in der Möglichkeit der maßgeschneiderten Modifikation während der chemischen Synthese. Hier sind vor allem die Einführung von Reportermolekülen, die eine Detektion des Amyloids ermöglichen und die Modifikationen zur Stabilisierung gegen einen Abbau durch Ribonukleasen von großem Interesse.