

1 Einleitung

1.1 Prionkrankheiten

Prionkrankheiten, auch *transmissible spongiform encephalopathies* (TSE) genannt, gehören zur Gruppe der fatalen, neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und beruhen auf einer Fehlfaltung eines wirtseigenen Proteins. Neben anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Syndrom oder Chorea Huntington, nehmen die Prionkrankheiten eine besondere Stellung ein, da sie nicht nur sporadischen oder hereditären, sondern auch infektiösen Ursprungs sein können.

TSE-Krankheiten sind charakterisiert durch eine lange Inkubationszeit und einen nach den ersten klinischen Anzeichen stetigen progressiven Krankheitsverlauf, der durch typische neurologische Symptome wie den Verlust von geistigen Fähigkeiten (Demenz) und Bewegungsstörungen (Ataxie) gekennzeichnet ist und immer tödlich endet. Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch die Rückbildung von Nervenzellen zu charakteristischen Läsionen im Gehirn, die das Nervengewebe als schwammartig (*spongiform*) erscheinen lassen. Weitere Merkmale der Prionkrankheiten sind die Ablagerung von pathogenen Prionproteinen, so genannten Plaques, eine fehlende Immunantwort und Mikrogliose bzw. Astrocytose.

Die TSE-Krankheiten treten sowohl beim Tier als auch beim Menschen auf. Seit 1732 ist die Traberkrankheit (*Scrapie*) bei Schafen und Ziegen bekannt (McGowan, 1922). Nach der Verfütterung von unzureichend sterilisiertem Tiermehl aus *Scrapie*-infizierten Schafen wurde die Krankheit auf Rinder übertragen (Wells *et al.*, 1987), wodurch 1986 eine BSE-Epidemie (BSE = *bovine spongiform encephalopathy*) ausgelöst wurde. Weitere Vertreter der TSE sind die *chronic wasting disease* (CWD) bei Hirschen (Williams und Young, 1980), die *transmissible mink encephalopathy* (TME) bei Nerzen (Hartsough und Burger, 1965), die *feline spongiform encephalopathy* (FSE) bei Katzen (Pearson *et al.*, 1991) und die *exotic ungulate encephalopathy* (EUE) bei exotischen Huftieren (Wells *et al.*, 1987). Experimentell kann der *Scrapie*-Erreger auch auf viele andere Tierarten, z.B. Mäuse, Hamster oder Affen übertragen werden (Diringer, 1990; Prusiner, 1982; Gajdusek *et al.*, 1966).

Zu den Prionkrankheiten beim Menschen zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann *et al.*, 1936), die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) (Lugaresi *et al.*, 1986) und die Kuru-Krankheit (Gajdusek und Zigas, 1957). Während das GSS-Syndrom und die FFI durch

genetische Mutation hervorgerufene Erbkrankheiten darstellen und die Kuru-Krankheit nur bei Eingeborenenstämmen auf Papua-Neuguinea durch rituellen Kannibalismus auftrat, werden bei der CJD vier verschiedene Auslöser der Krankheit unterschieden: die sporadisch auftretende Creutzfeldt-Jakob Krankheit (sCJD), die ungefähr 85-90 % aller CJD-Fälle ausmacht, die familiäre CJD (fCJD), die bei 10-15 % aller CJD-Fälle auftritt, die iatrogene CJD (iCJD), die durch medizinische Unfälle verursacht wird und in etwa 5 % aller CJD-Fälle auftritt, und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD), die bis jetzt in ungefähr 5-10 % aller CJD-Fälle auftritt.

Die neue Variante der CJD ist seit 1996 bekannt und geht höchstwahrscheinlich auf eine orale Übertragung mit BSE-infektiösem Material zurück. Zahlreiche Evidenzen deuten auf einen Zusammenhang zwischen BSE und nvCJD hin. Das Glykosylierungsmuster und die Plaque-Formation zeigen, dass nvCJD durch denselben Erregerstamm verursacht wird, der BSE zu Grunde liegt (Collinge *et al.*, 1996). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Mäuse, die mit BSE- bzw. nvCJD-Material infiziert wurden, vergleichbare Inkubationszeiten und Läsionsprofile im Gehirn aufwiesen (Bruce *et al.*, 1997). Beide Krankheitsformen, BSE und nvCJD, unterscheiden sich in diesen pathologischen Kriterien von der sCJD. Die neue Variante der CJD zeigt auch ein anderes Krankheitsbild als die sCJD. Aus bisher ungeklärten Gründen tritt nvCJD bei verhältnismäßig jungen Personen auf, während die sCJD erst ab einem Alter von 55 Jahren ausbricht. Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang von BSE und nvCJD ist die zeitliche und geographische Übereinstimmung des Ausbruchs der neuen Variante mit der BSE-Epidemie. Die nvCJD ist zehn Jahre nach Beginn der BSE-Epidemie in Großbritannien aufgetreten (Will *et al.*, 1996) und hat dort die meisten Opfer gefordert. Außerdem zeigen mehrere Experimente, dass eine Übertragung von BSE auf den Menschen sehr wahrscheinlich sein kann: Darunter sind die Übertragung des BSE-Erregers auf Makaken (Lasmezas *et al.*, 1996) sowie die Infektion von anderen Primatenaffen (Bons *et al.*, 1999) zu nennen. Bosque *et al.* (2002) wiesen erstmals hohe Titer an *Scrapie*-Erregern im Skelettmuskel nach intramuskulärer Injektion in Mäusen nach. Weiterhin führte eine orale Verabreichung von infektiösem *Scrapie*-Material an Hamster ebenfalls zu einer Erregerablagerung im Muskelgewebe dieser Tiere (Thomzig *et al.*, 2003), die vor Auftreten der ersten klinischen Symptome nachweisbar war (Thomzig, *et al.*, 2004). Obwohl BSE-Erreger noch nicht im Muskelgewebe von kranken Rindern nachgewiesen werden konnte, ist das potenzielle Vorkommen des infektiösen Materials in Muskeln im Hinblick auf die orale Übertragbarkeit auf den Menschen alarmierend.

1.2 Das Prionprotein (PrP)

Auf der Suche nach dem TSE-Erreger entwickelte Stanley B. Prusiner 1982 die *protein-only-hypothese*, wonach Proteine den alleinigen Bestandteil des infektiösen Agens der TSE-Krankheiten darstellen. Obwohl in der Literatur immer noch die Möglichkeit einer im Protein versteckten Nucleinsäure (Virus-Hypothese) diskutiert wird (Diringer *et al.*, 1994; Manuelidis *et al.*, 1995; Chesebro, 1998), hat sich die *protein-only-hypothese*, die durch viele Hinweise erhärtet werden konnte, durchgesetzt (z.B. Büeler *et al.*, 1993; Legname *et al.*, 2004; Safar *et al.*, 2005). Um diese neuen infektiösen Partikel von den bis dahin bekannten Erregern wie Viren oder Bakterien abzugrenzen, wurde der Begriff „Prion“ für *proteinaceous infectious particles* (proteinartige, infektiöse Teilchen) von S. Prusiner geprägt (Prusiner, 1982). Es stellte sich heraus, dass das infektiöse Agens nur aus der fehlgefalteten Form des wirtseigenen zellulären Prionproteins besteht (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1982). Da das Prionprotein sowohl in gesunden als auch in infizierten Organismen exprimiert wird (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985), lag die Schlussfolgerung nah, dass zwei verschiedene Konformationen des Prionproteins existieren, die sich in ihren biochemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden: eine normale, zelluläre Form PrP^C (Prionprotein *cellular*) und eine fehlgefaltete, pathogene Form PrP^{Sc} (Prionprotein *scrapie*).

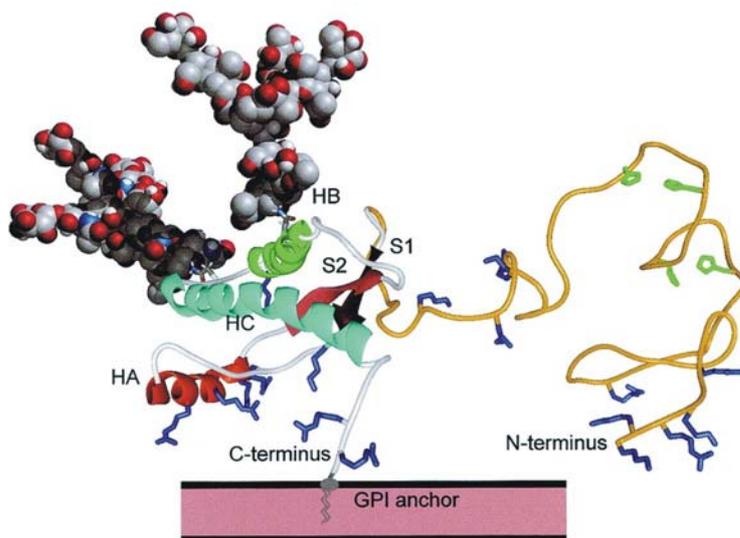


Abbildung 1-1: Strukturmodell des zellulären PrP^C aus *mesocricetus aureus* (DeArmond *et al.*, 1999). Die Reste 125-231 sind nach der NMR-Struktur (*ribbon-Modell*) aus James *et al.* (1997) mit modellierten Glykosylierungen (*Kalottenmodell*) abgebildet, die N-terminale Region (AS 23-124) ist als *random coil* (orange) dargestellt. Der GPI-Anker ist grau, Histidinreste sind grün und Lysin- und Argininreste sind blau gefärbt. HA: α -Helix 1 (AS 144-156), HB: α -Helix 2 (AS 177-193), HC: α -Helix 3 (AS 200-223), S1 und S2: β -Faltblatt (AS 128-131 und 160-164).

PrP^C ist ein über viele Spezies konserviertes, extrazelluläres Membranprotein, das in verschiedenen Zelltypen darunter Neuronen, Gliazellen, Lymphozyten und Muskelzellen exprimiert wird (Kretschmar *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1998; Cashman *et al.*, 1990). Über

einen GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker) am Serinrest 231 ist das Protein mit der Membran verbunden (Stahl *et al.*, 1987). Weitere posttranslationale Modifikationen beinhalten die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 179 und 214 (Turk *et al.*, 1988) und N-Glykosylierungen an den Asparaginresten 181 und 197 (Endo *et al.*, 1989). Der weitgehend unstrukturierte N-Terminus des Prionproteins (AS 23-120) enthält eine *Oktarepeat*-Domäne - eine fünfmalige Wiederholungssequenz von acht Aminosäuren (AS), die zweiwertige Metallionen wie Kupfer binden kann (Brown *et al.*, 1997; Stöckel *et al.*, 1998) -, und eine hydrophobe Domäne (AS 112-124). Aus NMR-Strukturuntersuchungen ist der Aufbau der hochstrukturierten C-terminalen Domäne (AS 121-231) bekannt, die aus drei α -Helices und einer β -Faltblattstruktur besteht (Riek *et al.*, 1997; 1998; James *et al.*, 1997; siehe Abbildung 1-1). Die α -helikalen Strukturen bilden dabei einen Anteil von 40 % und die β -Faltblattstrukturen einen Anteil von 3 %.

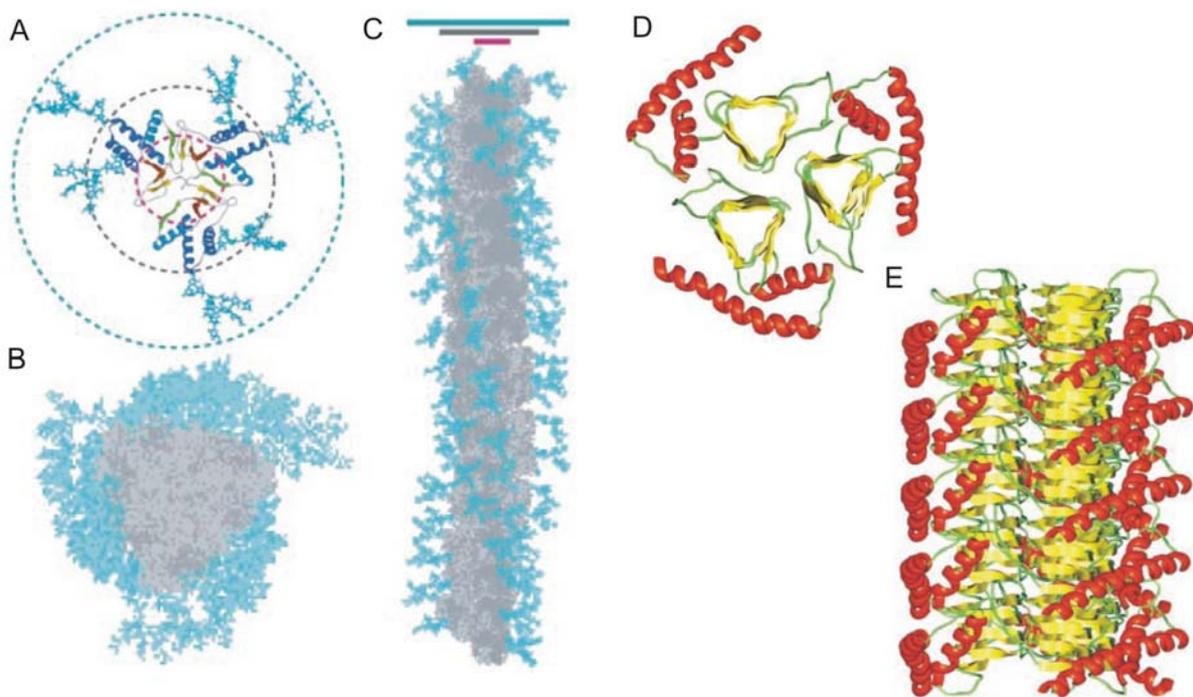


Abbildung 1-2: Modelle der pathogenen Form des Prionproteins PrP^{Sc} sowie Modelle von Protofibrillen. Bilder A-C sind aus DeMarco und Daggett, 2004, Bilder D und E aus Govaerts *et al.*, 2004. **A:** Trimeres Modell von PrP^{Sc} mit Glykosylierungen. Der umgefaltete Bereich des Prionproteins mit hohem β -Faltblatt-Anteil ist rot und grün dargestellt, die α -Helices (nach der NMR-Struktur des PrP^C) blau und die Glykosylierungen hellblau. **B:** Gleiche Ansicht des trimeren Modells von PrP^{Sc} wie in Bild A als Kalottenmodell. Das Protein ist grau, die Glykosylierungen sind hellblau gefärbt. **C:** Bildung einer Protofibrille aus übereinander gelegten Stapeln der trimeren Modelle aus B. In diesem Modell bildet die Fibrille eine Spirale mit einer 3_1 -Symmetriachse. **D:** Trimeres Modell von PrP^{Sc}. Die Reste 89-174 (gelb) sind nach einer linkshändigen β -Helix modelliert, die Reste 177-227 (rot) entsprechen der NMR-Struktur des PrP^C. **E:** Bildung einer Protofibrille aus übereinander gelegten Stapeln der trimeren Modelle aus D entlang einer Symmetriachse.

Dagegen weist die infektiöse Konformation PrP^{Sc} einen höheren Anteil von β -Faltblattstrukturen (43 %) und einen verringerten Anteil an α -Helices (30 %) auf (Hope und Manson, 1991). Die Struktur von PrP^{Sc} konnte wegen der Unlöslichkeit der Aggregate bisher nicht aufgeklärt werden. In der Literatur sind lediglich Strukturmodelle von PrP^{Sc} beschrieben worden, die von einer Umfaltung des Prionproteins im Bereich des β -Faltblatts und der α -Helix 1 ausgehen (DeMarco *et al.*, 2004; Govaerts *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2001; siehe Abbildung 1-2). Die fehlgefalteten Prionproteine lagern sich an den exponierten hydrophoben Aminosäureresten in der β -Faltblattstruktur zu symmetrischen Protofibrillen zusammen, die wiederum die unlöslichen Prion-Aggregate bilden (DeMarco *et al.*, 2004; Caughey und Raymond, 1991; Pan *et al.*, 1993). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Konformationen ist die Proteinase K-Sensitivität. Während die zelluläre Form durch Proteinase K (PK) vollständig abgebaut wird, verbleibt bei PrP^{Sc} ein resistenter Kern übrig, der als PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet wird (McKinley *et al.*, 1983).

Die Replikation des infektiösen Agens findet durch den direkten Kontakt der pathogenen Form PrP^{Sc} mit der zellulären Form PrP^C wahrscheinlich in lysosomalen Kompartimenten oder auf der Zelloberfläche statt (Caughey und Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1995). Dabei fungiert PrP^{Sc} als eine Art Template oder Nukleationskeim, um die zelluläre Form in die pathogene Form zu konvertieren (Prusiner, 1991; Jarrett und Lansbury, 1993). Die neu entstandenen PrP^{Sc}-Moleküle sind ihrerseits in der Lage zelluläres PrP^C in die pathogene Konformation umzufalten, wodurch eine Amplifikation von PrP^{Sc} hervorgerufen wird. Nach der Umfaltung von PrP^C wird dieses nicht mehr metabolisiert und lagert sich in Form von Aggregaten in den Zellen ab.

PrP^{Sc} lässt sich anhand verschiedener Inkubationszeiten, Läsionsprofile und Glykosylierungsmuster in verschiedene Erregerstämme einteilen (DeArmond *et al.*, 1993; Bessen *et al.*, 1995; Safar *et al.*, 1998). Da bisher alle Versuche, in zellfreien *in vitro* Systemen rekombinantes PrP^C *de novo* in infektiöses PrP^{Sc} zu konvertieren, fehlgeschlagen sind, wird vermutet, dass für die Umfaltung weitere unbekannte Helfermoleküle oder Kofaktoren (Protein X) nötig sind (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997).

1.3 Diagnose von Prionkrankheiten

1.3.1 Notwendigkeit für eine präsymptomatische Diagnose

Zurzeit existieren keine exakten *pre mortem* bzw. präsymptomatischen Diagnosemethoden für TSE-Krankheiten, aber der Bedarf an sensitiven, zuverlässigen und kostengünstigen Diagnosemöglichkeiten wächst aus folgenden Gründen zunehmend: Bis heute wurden

weltweit ca. 190.000 BSE-Fälle (Quelle: http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm, Stand: 5.5.2006) registriert, davon 396 in Deutschland (Quelle: Verbraucherministerium, Stand: 31.3.2006). Durch die nachhaltigen Kontrollen und das Verbot von Tiermehl als Futter ist die Zahl infizierter Tiere in Europa stetig zurückgegangen. Jedoch werden nach EU-Recht (Verordnung (EG) 999/2001) alle für den Verzehr geschlachteten Rinder, die älter als 30 Monate sind, sowie alle not- und krankgeschlachteten Tiere mit einem Alter von mehr als 24 Monaten einem BSE-Test unterzogen (Quelle: <http://www.bll.de/themen/bse/>). Die Zahl der nvCJD-Fälle mit 189 ist verhältnismäßig klein (Quelle: http://home.arcor.de/koeloe/CJD_und_nvCJD.htm, <http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm>, Stand: Mai 2006), doch lässt sich das Ausmaß dieser neuen infektiösen und fatalen Krankheit des Menschen wegen der langen Inkubationszeit noch nicht abschätzen. Da nvCJD wahrscheinlich durch orale Aufnahme BSE-infizierten Materials hervorgerufen wird (siehe 1.1) und Tierprodukte in der Kosmetik- und Pharmaindustrie eingesetzt werden, ist es für den Verbraucherschutz außerordentlich wichtig, geeignete sensitive Nachweisverfahren zu entwickeln und die Infektivität von Tierprodukten eindeutig zu bestimmen.

Die präsymptomatische Diagnose ist auch für eine geeignete Therapie gegen die Prionkrankheiten unumgänglich. Wie Tiermodelle zeigen, könnten therapeutische Maßnahmen in einem sehr frühen Stadium der Krankheit zumindest zu einer Verzögerung, wenn nicht sogar Heilung der Krankheit führen (Aguzzi *et al.*, 2001; Dormont *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003). Sind die ersten klinischen Symptome aufgetreten, ist es bereits zu einem irreversiblen Hirnschaden gekommen, der mit den heute bekannten Methoden nicht geheilt werden kann und unweigerlich zum Tod führt.

Eine weitere Gefahr stellt die iatrogene Übertragbarkeit der TSE-Krankheiten dar. Erst kürzlich wurde von einem Fall berichtet, in dem nvCJD höchstwahrscheinlich durch eine Bluttransfusion übertragen wurde (Llewelyn *et al.*, 2004). In Tiermodellen konnte die Infektiosität von Blut vor Ausbruch der klinischen Symptome nachgewiesen werden (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 1999a). Eine präklinische Diagnose von Prionkrankheiten ist daher auch bei Organtransplantationen, Bluttransfusionen und bei der Herstellung von Plasma-Produkten zwingend notwendig.

1.3.2 Gegenwärtige Diagnose-Techniken

Die Creutzfeldt-Jakob Krankheit wird anhand der klinischen Symptome diagnostiziert. Häufig können andere Hilfsmittel wie *magnetic resonance imaging* (MRI) oder Elektroenzephalographie (EEG), bei der krankhafte Veränderungen der elektrischen

Hirnaktivität erfasst werden, die Diagnose unterstützen (Soto, 2004). Ein eindeutiges Ergebnis kann allerdings erst *post mortem* erfolgen. Durch Biopsie können die Prionkrankheiten hinreichend nachgewiesen werden, jedoch sind diese Eingriffe sehr teuer, zeitaufwendig und risikoreich.

Von der europäischen Kommission für BSE-Detektion sind fünf BSE-Tests für die Diagnose von BSE bei geschlachteten Tieren zugelassen (Moynagh *et al.*, 1999; Schimmel *et al.*, 2002). Bis jetzt gibt es keinen offiziell zugelassenen Test auf BSE an lebenden Rindern. Die BSE-Tests basieren auf der Immunodetektion (Western Blot, ELISA) des pathologischen PrP^{Sc} in Hirnhomogenaten. Zur Unterscheidung der beiden Prionproteinkonformationen wird in vier Assays proteolytischer Verdau des Hirnhomogenats eingesetzt. Kürzlich wurde allerdings berichtet, dass rund 90 % des PrP^{Sc}, das aus Hirnen von verstorbenen Creutzfeldt-Jakob-Patienten isoliert wurde, PK-sensitiv war (Tremblay *et al.*, 2004; Safar *et al.*, 2005a; 2005b). Dieser Befund hat Auswirkungen auf den Nachweis und die Reinigung von PrP^{Sc}, die bislang immer unter Ausnutzung der angenommenen PK-Resistenz durchgeführt wurden. Deshalb wird im fünften BSE-Test der *conformational-dependent immunoassay* (CDI) verwendet, der sowohl PK-sensitives als auch PK-resistentes PrP^{Sc} erkennen kann (Safar *et al.*, 1998).

1.3.3 Neue Diagnose-Strategien

PrP^{Sc} ist nicht nur die einzige bekannte Komponente des infektiösen Agens der Prionkrankheiten, sondern auch der einzige zugelassene Marker (Prusiner, 1998; Ingrosso *et al.*, 2002). Für einen Nachweis der TSE-Krankheiten in lebenden Organismen ist es notwendig, einfacher zugängliche Gewebe als das Gehirn zu nutzen. Blut scheint ein geeigneter Kandidat für einen einfachen Diagnosetest zu sein (Brown *et al.*, 2001a; Brown, 2000; Aguzzi, 2000; Mabbott und MacPherson, 2006). Jedoch ist die Konzentration von PrP^{Sc} in Blut sehr gering und es bedarf sensitiver Assays für einen verlässlichen Nachweis der Krankheit. Neue Diagnosetechniken zielen deshalb auf die Entwicklung von sensitiveren und spezifischeren Methoden zum Nachweis von PrP^{Sc} in Körperflüssigkeiten und auf die Identifizierung von neuen Surrogatmarkern. Im Folgenden werden exemplarisch einige der neuen Diagnose-Strategien vorgestellt.

Mehrere spektroskopische Methoden darunter die Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie (FTIR), die Konfokal-Dualfarben-Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS), die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIF) und mit Fluoreszenztechnik gekoppelte Kapillarelektrophorese werden zur PrP^{Sc}-Detektion in Körperflüssigkeiten eingesetzt (Lasch *et al.*, 2003; Bieschke *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005;

Schmerr *et al.*, 1998). Erst kürzlich wurde ein Fluoreszenzassay entwickelt, der palindromische fluoreszierende Polypeptide verwendet, die spezifisch die pathogene Konformation des Prionproteins erkennen (Tcherkasskaya *et al.*, 2005). Bei allen Methoden bestehen aber noch viele Nachteile, sei es die Sensitivität oder die Handhabbarkeit, als dass sie in der Routinediagnostik eingesetzt werden könnten.

Eine weitere Möglichkeit einer sensitiveren Nachweismethode ist die PrP^{Sc}-Konzentration in den zu untersuchenden Proben zu erhöhen, so dass sie verlässlich mit den bisherigen Methoden detektierbar ist. Mit Natriumphosphowolframat konnte PrP^{Sc} selektiv präzipitiert und mit einem Chemilumineszenzsystem detektiert werden (Wadsworth *et al.*, 2001). Dieser Nachweis kann allerdings nicht für Blut verwendet werden. Ein Durchbruch gelang Castilla *et al.* (2005), als die Gruppe mit Hilfe der PMCA-Technologie (*protein misfolding cyclic amplification*) Prionen in Blut nachweisen konnten. Über eine zyklische Amplifikation, bestehend aus Ultraschallbehandlung von infektiösen Material und Inkubation der zerkleinerten Partikel mit zellulärem PrP^C, können selbst geringste Mengen an PrP^{Sc} detektiert werden. Jedoch ist der Assay auf gesundes Hirnhomogenat angewiesen und sehr zeitaufwendig. Einige Moleküle wie Plasminogen oder Streptomycin scheinen eine hohe PrP-Affinität zu besitzen und können für die Detektion von PrP^{Sc} in Plasma eingesetzt werden (Fischer *et al.*, 2000; Bencsik *et al.*, 2006).

Außerdem wurden andere krankheitsspezifische Markerproteine in der Cerebrospinal Flüssigkeit (CSF), darunter hyperphosphoryliertes Tauprotein, S100 β Protein, Neuroprotein 14-3-3 und neuronspezifische Enolase (Bautista *et al.*, 2006; Beekes *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2002; Bieschke *et al.*, 2000), und Kandidaten für veränderte Genexpression während der TSE-Krankheit (Clinton *et al.*, 2006; Riemer *et al.*, 2004) entdeckt, die in zukünftigen Diagnose-Assays eine Rolle spielen könnten.

1.3.4 Antikörper gegen das Prionprotein

Weitere sensitive Werkzeuge für neue Diagnose-Assays sind PrP^{Sc}-konformationsspezifische Antikörper. Über lange Zeit konnten Anti-PrP Antikörper nur mehrere Konformationen des Prionproteins erkennen, wodurch ein Proteinase K-Verdau oder ein Denaturierungsprozess vor der Detektion unumgänglich gemacht wurden. Proteinase-sensitive Formen des pathogenen Prionproteins wurden dabei nicht berücksichtigt. Der viel versprechende Antikörper 15B3 (Korth *et al.*, 1997; 1999), der spezifisch PrP^{Sc}, aber nicht PrP^C immunpräzipitieren konnte, war vor allem wegen seiner geringen Affinität für die Diagnose nicht geeignet (Soto, 2004).

Moroncini *et al.* (2004) verfolgten eine neue Methode, bei der in Anti-PrP Antikörper jeweils die PrP-Sequenzen 89-112 und 136-158, die wahrscheinlich an der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} beteiligt sind, eingefügt wurden. Die präparierten Antikörper waren in der Lage, spezifisch sowohl PrP^{Sc} als auch PrP²⁷⁻³⁰ zu erkennen und im nanomolaren Bereich zu binden. Eine weitere Strategie war die Verwendung eines konformationsspezifischen Antigens bestehend aus Tyrosin-Tyrosin-Arginin-Wiederholungen, um PrP^{Sc}-spezifische Antikörper zu generieren (Paramithiotis *et al.*, 2003).

Der Antikörper V5B2 war gegen ein Epitop am C-terminalen Ende des Prionprotein gerichtet (Curin Serbec *et al.*, 2004). Wie Analysen mittels *dot blot*, ELISA, Immunopräzipitation und Immunohistochemie zeigen, erkennt dieser Antikörper spezifisch pathogene Konformation aus CJD-Patienten und nicht PrP^C.

Von Pan *et al.* (2005) wurde ein aggregationsspezifischer ELISA entwickelt, indem monoklonale Antikörper auf ihre Fähigkeit PrP-Dimere zu binden überprüft wurden. Neben anderen Antikörpern wurde MA b 11G5 gegen die Aminosäurereste 114-130 identifiziert, der neben den Dimeren auch PrP^{Sc} aus infizierten Hirnhomogenat, aber nicht das Prionprotein aus gesundem Hirnhomogenat erkennen konnte.

Schließlich wurde von einem Anti-DNA Antikörper (OCD4) berichtet, der spezifisch PrP aus infizierten Hirnhomogenaten aus Menschen und Tieren, aber nicht aus gesunden Hirnproben binden konnte (Zou *et al.*, 2004). Der Antikörper reagiert mit DNA, die mit PrP^{Sc} einen konformationsabhängigen Komplex einzugehen scheint.

Obwohl in den letzten Jahren diese PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper isoliert wurden, konnten sie bisher nicht zufrieden stellend in der Diagnostik eingesetzt werden. In weiterführenden Studien wird ihre Eignung für die Diagnose überprüft.

1.4 *In vitro* Selektion von Aptameren

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nucleinsäuren, die aufgrund ihrer drei dimensional Struktur hochaffin und spezifisch an eine Vielzahl von Molekülen binden können. Ihr Name leitet sich aus dem Lateinischen *aptus* für passend ab (Ellington und Szostak, 1990). Aptamere werden aus komplexen kombinatorischen Bibliotheken von Oligonucleotiden mit Hilfe der *in vitro* Selektion in einer definierten Umgebung generiert. Für das *in vitro* Selektionsverfahren wurde von Tuerk und Gold (1990) der Begriff SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) geprägt.

Nucleinsäuren haben den Vorteil, dass sie Genotyp und Phänotyp in sich vereinigen, d.h. dass die Oligonucleotide nicht nur ihre eigene Bauanleitung in Form der genetischen Information enthalten, sondern auch durch ihre Struktur Funktionen übernehmen können.

Schon 1967 wurde das Prinzip der *in vitro* Selektion von Millis *et al.* (1967) auf sich selbst replizierende RNA angewendet. Die technische Anwendung der *in vitro* Selektion wurde zum ersten Mal durchgeführt, als aus genomischer DNA Sequenzen isoliert wurden, die den Transkriptionsfaktor TFIIA binden konnten (Kinzler und Vogelstein, 1989). 1990 wurde in drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das Verfahren der *in vitro* Selektion etabliert. Erstmals erfolgte hier die Arbeit mit partiell veränderten oder vollständig synthetisierten Bibliotheken. Robertson und Joyce (1990) konnten aus Strukturvarianten des *Tetrahymena* Ribozyms Sequenzen selektieren, die anstelle von RNA einzelsträngige DNA spalteten. In einer anderen Arbeit wurden innerhalb einer RNA, die an T4-DNA Polymerase bindet, acht Nucleotide variiert und der so gewonnene Pool gegen die T4-DNA Polymerase selektiert. Neben dem Wildtyp konnten noch andere Sequenzen identifiziert werden, die die gleichen Bindungseigenschaften erfüllten (Tuerk und Gold, 1990). Schließlich konnten aus einer chemisch synthetisierten RNA-Bibliothek mit randomisierten Bereichen spezifisch Farbstoff-Binder generiert werden (Ellington und Szostak, 1990).

1.4.1 Selektionszyklus

Das SELEX-Verfahren zur Gewinnung von RNA-Aptameren lässt sich in die Konstruktion des Ausgangspools, die *in vitro* Selektion bestehend aus einem zyklischen Prozess von Selektion und Amplifikation sowie die Analyse der erhaltenen Aptamere einteilen (Conrad *et al.*, 1996; Fitzwater und Polisky, 1996; siehe Abbildung 1-3).

Für die *in vitro* Selektion ist es von Bedeutung, die höchstmögliche Komplexität der Ausgangsbibliothek einzusetzen. Es werden meistens vollständig synthetisierte Bibliotheken verwendet, wobei Regionen aus bis zu 120 randomisierten Nucleotiden mit Hilfe der automatischen Festphasensynthese hergestellt werden können. Es ergibt sich eine theoretische Komplexität von bis zu 4^{120} ($1,8 * 10^{72}$) verschiedenen Molekülen, von denen experimentell etwa 10^{12} - 10^{18} erreicht werden können (Joyce, 1994). Die meisten Bibliotheken bestehen aus randomisierten Bereichen zwischen 30 und 80 Nucleotiden, die von zwei Primerregionen flankiert werden. Die konstanten Bereiche werden für die Komplettierung der einzelsträngigen DNA in doppelsträngige DNA und ihre Amplifikation mittels PCR benötigt. Mit Hilfe von geeigneten Primern, die über den Hybridisierungsbereich hinausragen, kann die

DNA weiter verlängert und ein T7-Promotor eingeführt werden. So ist es möglich, die DNA-Bibliothek mittels T7-RNA-Polymerase in eine RNA-Bibliothek zu transkribieren.

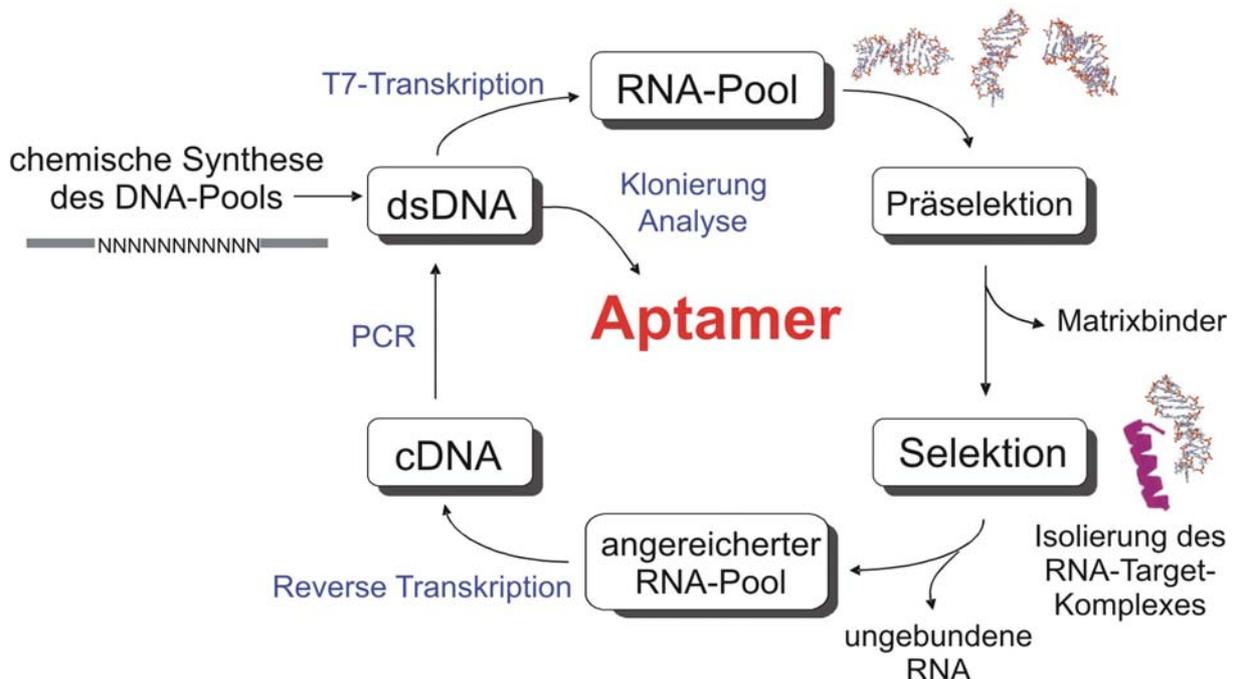


Abbildung 1-3: Schema zur *in vitro* Selektion von RNA-Aptameren. Aus einer chemisch synthetisierten einzelsträngigen DNA-Bibliothek wird über enzymatische Reaktion eine RNA-Bibliothek erstellt. Aus diesem Pool werden in einem zyklischen Prozess aus Selektion und Amplifikation RNA-Moleküle mit einer hohen Affinität für ein gewähltes Target generiert. Der angereicherte DNA-Pool kann schließlich durch molekulare Klonierung vereinzelt und analysiert werden.

Der entscheidende Schritt des SELEX-Experiments ist die eigentliche Selektion, bei der die RNA-Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften isoliert werden. Dabei wird die selektierte RNA im RNA-Target Komplex von den restlichen ungebundenen Molekülen abgetrennt. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten, um die RNA-Target Komplexe zu isolieren. Nach einer Inkubation der RNA-Bibliothek mit dem Zielmolekül in Lösung können beispielsweise die gebildeten Komplexe durch Filtration über eine Nitrocellulosemembran (Conrad *et al.*, 1996; Ruckman *et al.*, 1998; White *et al.*, 2003a) oder durch Zentrifugation (Lowary und Widom, 1998; Blank *et al.*, 2001) abgetrennt werden. Bei der Selektion gegen kleinere Target-Moleküle bietet sich die Immobilisierung des Zielmoleküls auf einer Matrix an. Dabei können die Moleküle direkt chemisch mit der Matrix verbunden werden (Klußmann *et al.*, 1996; Srisawat und Engelke, 2001) oder indirekt über eine geeignete Modifikation an die Matrix immobilisiert werden. In der Literatur ist z.B. die Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Vo *et al.*, 2003) oder der Einsatz von Streptavidin bedeckten magnetischen Partikeln (Tahiri-Alaoui *et al.*, 2002; Muphy *et al.*, 2003)

beschrieben worden. Die Inkubation der RNA-Bibliothek mit den immobilisierten Target-Molekülen kann dabei entweder im *batch*-Verfahren oder über eine Affinitätschromatographie erfolgen. Nicht-bindende RNA-Moleküle werden anschließend durch stringentes Waschen heruntergespült.

Trotzdem stellt die Kontamination mit so genannten Matrixbindern ein großes Problem dar. Deshalb sollte vor jeder Selektionsrunde mindestens eine Präselektion gegen die Matrix durchgeführt werden, um eine Anreicherung an Matrix-affinen RNA-Molekülen zu verhindern. Weitere Möglichkeiten Matrixbinder zu vermeiden bestehen darin, während der Selektion die Matrix zu wechseln oder die Menge an angebotenen Zielmolekülen zu erhöhen. Stringente Waschbedingungen wirken auch förderlich, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Schließlich können durch die Vereinzelung des angereicherten Pools während der Klonierung affine Aptamere von Matrixbindern getrennt werden (Conrad *et al.*, 1996).

Aus dem RNA-Target Komplex werden die selektierten RNA-Moleküle isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Nach der Amplifikation steht eine mit affinen Bindern angereicherte Bibliothek für die nächste Selektionsrunde zur Verfügung. In mehreren Zyklen werden so die affinen Moleküle exponentiell angereichert, während die Komplexität des Ausgangspools sinkt. Ist eine weitere Steigerung der Bindung nicht mehr möglich, werden die PCR-Produkte aus der letzten Selektionsrunde vereinzelt und sequenziert. Die Sequenzen werden auf mögliche Bindungsmotive in der Primär- und Sekundärstruktur untereinander verglichen und weiter charakterisiert.

Durch Einführung von Mutagenese in den Selektionszyklus (*in vitro* Evolution) können neue Varianten der Aptamere erzeugt und die Affinitäten weiter verbessert werden. Das Verfahren der Gegenselektion (*counter-selection*) durch Einsatz von kompetitiven Molekülen kann ebenso für die Erhöhung der Selektivität und besonders der Spezifität eingesetzt werden. Beispielsweise konnten Aptamere isoliert werden, die in der Lage waren zwischen den Purinderivaten Theophyllin und Coffein, die sich nur durch eine Methylgruppe unterschieden, um den Faktor 10^4 zu diskriminieren (Jenison *et al.*, 1994).

1.4.2 DNA-Bibliotheken

Analog zu RNA-Bibliotheken können auch DNA-Bibliotheken für *in vitro* Selektionen eingesetzt werden. In der Literatur sind bereits eine Vielzahl von DNA-Aptameren beschrieben worden, die ähnliche Bindungskonstanten wie RNA-Aptamere aufweisen. Die ersten DNA-Aptamere wurden 1992 gegen verschiedene Farbstoffe (Ellington und Szostak, 1992) bzw. gegen menschliches Thrombin (Bock *et al.*, 1992) erhalten. Für eine Selektion mit

DNA-Molekülen muss das Vorgehen nach der schematischen Abbildung 1-3 abgewandelt werden. Mittels Festphasensynthese wird auch hier eine einzelsträngige DNA-Bibliothek erstellt, die aus den beiden flankierenden Primerregionen und dem randomisierten Bereich besteht und direkt für die Selektion eingesetzt werden kann. Eine Umschreibung in RNA über die T7-Transkription und die Rückführung in cDNA über die reverse Transkription entfallen. Nach der Selektion und Amplifikation liegt die DNA allerdings im Doppelstrang vor, der für den Einsatz in die nächste Selektionsrunde aufgetrennt werden muss. Für die Strangtrennung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Neben der asymmetrischen PCR (Gyllensten und Erlich, 1988; Ellington und Szostak, 1992) und der Biotinylierung eines Stranges der DNA-Doppelhelix (Schneider *et al.*, 1995) ist der selektive Verdau des 5'-phosphorylierten Stranges einer Doppelstrang-DNA durch die Lambda Exonuclease (Null *et al.*, 2000; Carrigan, 2004) zu nennen. Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von einzelsträngiger DNA ist Auftrennung der beiden DNA-Stränge über ein denaturierendes Polyacrylamidgel, nachdem ein Strang hinreichend über einen geeigneten Primer modifiziert wurde. Es können z.B. ein Hexaethylenglycol-Linker mit einer Verlängerung des Primers um 20 Nucleotide (Williams und Bartel, 1995) oder drei Biotinreste am 5'-Ende eines Stranges (Beutel und Gold, 1992) eingeführt werden, so dass sich durch die unterschiedliche Größe der beiden komplementären Stränge ein verändertes Laufverhalten im denaturierendem Gel ergibt.

1.5 Aptamere und ihre Anwendungen

Seit den grundlegenden Arbeiten aus dem Jahr 1990 wurde die *in vitro* Selektion auf eine reichhaltige Palette an Zielmolekülen und Applikationen gerichtet. Die als Zielmoleküle eingesetzten Substanzen reichen von Metallen (Hofmann *et al.*, 1997) oder kleinen organischen Molekülen wie biologischen Kofaktoren (Burgstaller und Famulok, 1994; Sasanfar und Szostak, 1993), Farbstoffen (Ellington und Szostak, 1990), Antibiotika (Lato *et al.*, 1995; Wallis *et al.*, 1995) oder Aminosäuren (Connell *et al.*, 1993; Majerfeld und Yarus, 1994), über Peptide (Nieuwlandt *et al.*, 1995) und größere Proteine wie Wachstumsfaktoren (Ruckman *et al.*, 1998), Hormone (Proske *et al.*, 2002b), Antikörper (Tsai *et al.*, 1992; Hamm, 1996) oder Enzyme (Zhang *et al.*, 2003) bis zu komplexen Strukturen wie Amyloide (Ylera *et al.*, 2002), Rezeptorproteine (Ulrich *et al.*, 1998; 2004) oder sogar gesamte Zelle bzw. Viren (Homann und Göringer, 1999; Ulrich *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 1995). In den letzten Jahren konnte die *in vitro* Selektion verbessert werden, indem der Prozess durch geeignete Methoden wie die Kapillarelektrophorese (Berezovski, 2005) verkürzt oder automatisiert wurde (Eulberg *et al.*, 2005; Cox *et al.*, 2002).

Die Anwendungsmöglichkeiten der selektierten Aptamere sind vielfältig und unterstreichen das hohe Potential der Aptamere als maßgeschneiderte Werkzeuge in der Aufklärung von Zellmechanismen, Target-Validierung, Reinigungsprozessen, Entwicklung von Medikamenten und Katalysatoren sowie diagnostischen und therapeutischen Fragestellungen. Aptamere sind hochwertige Diagnostika, die in *in vitro* Assays oder *in vivo* Imaging eingesetzt werden, wo sie häufig Antikörper ersetzen. Erst kürzlich wurde ein Aptamer Chip mit ungefähr 50 verschiedenen Analyten von der Firma Somalogic Inc. (Boulder, USA) entwickelt (Heilig, 2004). Diagnostische Aptamer-Assays erreichen eine sehr geringe Detektionsgrenze, sind einfach zu handhaben, flexibel und weisen einen geringen Hintergrund auf. Fredriksson *et al.* (2002) konnten mit Hilfe eines *proximity-ligation assays* Proteine im zeptomolaren Bereich (10^{-21} mol) nachweisen. In diesem Assay können zwei Aptamere, die durch ihre Bindung an unterschiedliche Epitope eines Targets in räumliche Nähe gerückt sind, enzymatisch ligiert werden. Das resultierende Oligonucleotid kann schließlich mit den entsprechenden Primern in einer *real-time* PCR quantitativ detektiert werden.

Aptamere wurden auch verwendet, um komplexe Moleküle z.B. in der HIV Diagnostik nachzuweisen (Sayer *et al.*, 2002). Darüber hinaus können Aptamere während der chemischen Synthese sehr einfach mit verschiedenen Modifikationen versehen werden, die normalerweise nicht die Bindungseigenschaften herabsetzen. Fluoreszierende Aptamere können z.B. für das *in vivo imaging* eingesetzt werden und pathogene Targets in Zellen oder Geweben sichtbar machen. Sogenannte *aptamer beacons* können ein Signal in Abhängigkeit von ihrer Struktur aussenden (Hamaguchi *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2000a). In Abwesenheit des Targets kann ein Quencher an das Fluorophor des Aptamers binden und die Aussendung eines Signals unterdrücken. Bindet das Aptamer an sein Target und verändert dadurch seine Struktur, verringert sich die Affinität des Quencher zum Fluorophor und ein Signal kann detektiert werden. Gerade toxische Substanzen oder immunogene Targets, bei denen Antikörper-Assays an ihre Grenze stoßen, können durch Aptamere in Biosensoren (Kleinjung *et al.*, 1998) hervorragend analysiert werden. Aptamere sind auch schon erfolgreich in ELISA-ähnlichen Assays (Baldrich *et al.*, 2004), in der *flow cytometry* (Davis, 1998) sowie in der Mikroskopie (Blank *et al.*, 2001) und in Quarzkristall-Biosensoren (Liss *et al.*, 2002) eingesetzt worden.

Außerdem sind Aptamere in der therapeutischen Anwendung auf dem Vormarsch (Nimjee *et al.*, 2005). Seit Dezember 2004 ist mit „Macugen“ (*pegaptanib*, Pfizer und Eyetech) gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) das erste Aptamer-Medikament auf den Markt gekommen (Eyetech study group, 2002, 2003).

Die größten Probleme für Aptamere in der therapeutischen und diagnostischen Applikation sind die Instabilität der RNA in physiologischen Medien, die schnelle Ausscheidung und der Transport des Aptamers in die Zelle. In den letzten Jahren sind allerdings zahlreiche Lösungsansätze entwickelt worden. Die Stabilität von RNA-Aptameren kann durch die nachträgliche Kombination von Modifikation der Nucleotide, z.B. durch den Austausch der 2'-Hydroxylgruppe durch 2'-Amino-, 2'-Fluoro, 2'-O-Methylgruppen (Pieken *et al.*, 1991; Paoletta *et al.*, 1992), den Einbau von Phosphorothioaten (Heidenreich *et al.*, 1994), LNAs (*locked nucleic acids*) oder *Capping* am 3'-Ende nachhaltig verbessert werden (Schmidt *et al.*, 2004; Darfeuille *et al.*, 2004). Es besteht jedoch die Gefahr, dass durch den nachträglichen Einbau von Modifikationen die Affinität zum Zielmolekül vermindert werden kann. Deshalb werden auch vollständige prämodifizierte RNA-Bibliotheken für die *in vitro* Selektion eingesetzt (Lin *et al.*, 1994; Ruckman *et al.*, 1998). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von so genannten Spiegelmeren, die aus nicht in der Natur auftretenden L-Ribose- bzw. L-2'-Deoxyribose-Einheiten bestehen und deshalb nicht von Enzymen erkannt und abgebaut werden (Klußmann *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1996).

Durch Kopplung des Aptamers mit Polyethylenglycol oder Cholesterol als Ankergruppe verbleibt das Medikament länger im Körper des Patienten und die Pharmakokinetik kann verbessert werden (Rusconi *et al.*, 2004). Der Transport in die Zelle wird mit Hilfe von Transfektionsreagenzien oder Transportmitteln wie z.B. Liposomen (White *et al.*, 2000) möglich.

1.6 Aptamere gegen das Prionprotein

Aptamere wurden in erster Linie gegen die zelluläre Form des Prionproteins generiert. Zurzeit sind Aptamere (drei RNA-Aptamere, ein DNA-Aptamer) gegen PrP^C in vier Veröffentlichungen beschrieben, die alle an den N-terminalen Bereich des zellulären Prionproteins binden (Weiss *et al.*, 1997; Proske *et al.*, 2002a; Sekiya *et al.*, 2006; Takemura *et al.*, 2006). Es wurde vorgeschlagen, die PrP^C-spezifischen Aptamere für eine PrP^{Sc}-Anreicherung in infektiösen Proben zu verwenden (Takemura *et al.*, 2006). Die Aptamere könnten PrP^C aus den Proben entfernen, einen PK-Verdau überflüssig machen und in Kombination mit Antikörpern einen spezifischen Nachweis für PrP^{Sc} erbringen. Darüber hinaus konnte das Aptamer DP7 erfolgreich in Prion-infizierten Neuroblastomazellen die Neubildung von Proteinase K-resistentem PrP^{Sc} um die Hälfte reduzieren (Proske *et al.*, 2002a) und eine therapeutische Applikation in Aussicht stellen.

Rhie *et al.* (2003) konnten aus einer 2'-Fluoro-markierten RNA-Bibliothek Aptamere gegen PrP^{Sc}-Fibrillen selektieren, die spezifisch an den C-terminalen Bereich von PrP^{Sc} binden. Das Aptamer SAF-93 ist auch in der Lage, in einem zellfreien *in vitro* Konversionsassay die Aggregation von PrP zu inhibieren. Eine verkürzte Variante des Aptamers SAF-93 konnte über ein mit Biotin modifiziertes Nucleotid an Streptavidin immobilisiert werden, um in diagnostischen Assays eingesetzt zu werden (Sayer *et al.*, 2004).

Trotz dieses viel versprechenden Ansatzes konnte das Aptamer nur um einen Faktor 10 zwischen den beiden Prionproteinkonformationen diskriminieren (Rhie *et al.*, 2003; Sayer *et al.*, 2004). Für eine verlässliche Diagnose der Prionkrankheiten ist eine Verbesserung der Spezifität der Aptamere erforderlich.

1.7 Aptamer versus Antikörper

Aptamere sind in vieler Hinsicht mit Antikörpern vergleichbar. Darüber hinaus bieten Oligonucleotide entscheidende Vorteile und können Antikörper in vielen Applikationen ersetzen. Der größte Vorteil der Aptamere liegt in ihrer Gewinnung und ihrem Aufbau. Die Isolierung der Aptamere erfolgt *in vitro*, so dass Epitope und Bindungsstellen gezielt ausgewählt werden können. Die Selektion von Aptameren gegen Toxine oder immunogene Substanzen wird somit möglich. Dabei erreichen Aptamere eine außergewöhnliche Spezifität und Selektivität. Die *in vitro* Selektion kann unter einer großen Bandbreite an verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden, während Antikörper nur unter physiologischen Bedingungen generiert werden können. Außerdem werden Aptamere chemisch synthetisiert, wodurch eine hohe Reinheit und Reproduzierbarkeit gewährleistet wird. Weiterhin werden Modifikationen oder der Einbau von Reportermolekülen (z.B. Fluorescein oder Biotin) an genau definierten Positionen durch die chemische Synthese erleichtert. Die Eigenschaften von Aptameren, wie kinetische Parameter, können auf Verlangen verändert werden. Nucleinsäuren sind im Gegensatz zu Antikörpern flexibler und lange lagerbar. Denaturierungsprozesse sind vollständig reversibel. Die geringe Größe von Aptameren ermöglicht die einfache Penetration in die extrazelluläre Matrix oder extravaskuläres Gewebe. Außerdem scheinen Aptamere nicht immunogen zu sein (Drolet *et al.*, 2000), was sie zu geeigneten Kandidaten für die Therapie, besonders gegen Allergien oder Autoimmunkrankheiten, macht.