

5 Diskussion

5.1 Diagnose der Prionkrankheiten

Prionkrankheiten sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch eine äußerst progressive Degeneration von Nervenzellen und Ablagerungen (Plaques) des fehlgefalteten Prionproteins (PrP^{Sc}) im Gehirn betroffener Organismen manifestieren. Gemäß der *prion-protein-only-hypothese* ist PrP^{Sc} Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prusiner *et al.* 1981; Prusiner 1982), die durch die induzierte Umfaltung und Aggregation des zellulären wirtseigenen Prionproteins (PrP^{C}) entstehen.

Im Laufe der BSE-Krise, die 1986 in Großbritannien ausgelöst wurde, sind die TSE-Krankheiten in das Bewusstsein der Bevölkerung getreten. Nicht nur agrikulturnelle Produzenten sind durch die Kontamination von Fleischprodukten betroffen, sondern auch die Kosmetik- und Pharmaindustrie, die tierische Materialien zur Herstellung ihrer Produkte verwenden, sowie Blut-, Gewebe- und Organbanken. Wegen der langen Inkubationszeit und Ungewissheiten bei der Entstehung und Übertragung der TSE-Krankheiten ist es schwierig das Ausmaß einer Infektion in Menschen und Tieren abzuschätzen. Eine eindeutige präklinische Diagnose bei lebenden Tieren oder Patienten ist im Moment nicht möglich. Die zurzeit verwendeten Diagnosemethoden richten sich nach den klinischen Symptomen und können nur *post mortem* durch neuropathologische Untersuchungen des Gehirns bestätigt werden. Es werden Antikörper gegen das im Gehirn gebildete PrP^{Sc} eingesetzt, wobei ein Proteinase K-Verdau zur Unterscheidung zwischen den Prionprotein-Konformationen notwendig ist.

Die Diskriminierung zwischen der pathogenen und zellulären Konformation des Prionproteins gestaltet sich als schwierig. In den vergangenen Jahren wurde vergeblich nach konformationsspezifischen Antikörpern gesucht; erst kürzlich konnten einige potentielle Antikörper isoliert werden (Soto, 2004). In vier unabhängigen Arbeiten wurden Aptamere gegen das zelluläre PrP^{C} isoliert (Weiss *et al.*, 1997; Proske *et al.*, 2002a; Sekiya *et al.*, 2006; Takemura *et al.*, 2006), die eine hohe Affinität gegen den N-terminalen Bereich von PrP^{C} aufwiesen. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Konformationen des Prionproteins konnte nicht erreicht werden. Gelretardationsassays zeigten, dass die Anti- PrP^{C} -Aptamere von Weiss *et al.* (1997) zwar schwächer an PrP^{Sc} banden, aber die pathogene Konformation dennoch erkannten. Dissoziationskonstanten der Aptamere wurden nicht bestimmt. Die Aptamere von Proske *et al.* (2002a) und Sekiya *et al.* (1997) wurden nicht bezüglich ihrer Affinität gegen PrP^{Sc} getestet. Im zeitlichen Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden weitere

Aptamere publiziert, die gegen Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) aus infizierten Hamsterhirnen selektiert worden waren (Rhie *et al.*, 2003; Sayer *et al.*, 2004). In Bindungsstudien wurde die Affinität des Aptamers SAF-93 für rekombinantes überexprimiertes Prionprotein, das entweder in die zelluläre α -Form oder in ein β -Oligomer umgefaltet wurde, ermittelt. Das Aptamer bindet zum einen unspezifisch an den N-Terminus des Proteins und zum anderen wahrscheinlich spezifisch an ein Epitop im Aminosäuresequenz-Bereich von 110-230. Im Vergleich zwischen α - bzw. β -Form des Prionproteins (23-231) konnte das Aptamer SAF-93 allerdings nur um einen Faktor von 5 diskriminieren. Weitere Studien (Sayer *et al.*, 2004) konnten den Diskriminierungsfaktor des Aptamer SAF-93₍₁₋₆₀₎ auf 10 verbessern, wobei Bindungskonstanten für die α -Form von $K_D = 60$ nM und für die β -Form von $K_D = 6$ nM bestimmt wurden. Die Aptamere können zwar minimal zwischen den beiden Konformationen unterscheiden, aber die Affinität des Aptamers für PrP^C liegt mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante im Bereich einer spezifischen Bindung. In Filterbindungsstudien (*slot blot assay*) konnte neben der β -Form auch immer die α -Form von PrP detektiert werden. Für den Einsatz in der Standarddiagnose ist eine sensitivere Unterscheidung zwischen den Isoformen erforderlich und eine Verbesserung der spezifischen Bindung und des Diskriminierungsfaktors wünschenswert. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene SELEX-Strategien verfolgt, um konformationsspezifische Epitope zu präsentieren und hochaffine Aptamere gegen die pathogene Form des Prionproteins PrP^{Sc} zu generieren (siehe Abbildung 5-1).

5.2 Selektion gegen infektiöses PrP²⁷⁻³⁰

Bei der ersten *in vitro* Selektion (SELEX 1) wurde als Target die infektiöse Fraktion PrP²⁷⁻³⁰ aus Hamsterhirnen und eine RNA-Bibliothek mit einer Zufallssequenz aus 60 Nucleotiden und einer Komplexität von $6 * 10^{15}$ verschiedenen RNA-Molekülen verwendet. Die Länge des randomisierten Bereichs ist für die Komplexität der kombinatorischen Bibliothek ausschlaggebend, da mit zunehmender Größe der Bibliothek die Strukturvielfalt erhöht wird. Der verwendete Zufallsbereich lag in der Größenordnung, der bereits in der Literatur für *in vitro* Selektionen beschrieben wurde.

Die gebildeten RNA-Target Komplexe wurden von freier RNA während der Selektion mittels Zentrifugation getrennt. Dabei ließ sich die Eigenschaft des Targets ausnützen, das in unlöslichen Aggregaten vorlag und pelletiert werden konnte. Um die Stringenz der Selektion zu erhöhen, wurde vor jeder Selektionsrunde eine Gegenselektion mit PrP^C durchgeführt.

| Bibliothek / Target | Methode / Runden | K_D / Diskriminierungsfaktor | Sekundärstruktur Bindungsmotiv | Kapitel |
|--|---|---|---|------------|
| <p>SELEX 1</p> <p>keine signifikante Anreicherung</p> | <p>RNA-Bibliothek 1 gegen PrP²⁷⁻³⁰ aus infizierten Hamsterhirn, Gegenselektion mit PrP^C</p> <p>Zentrifugations-assay 15 Runden</p> | | | 4.2.1, 5.2 |
| <p>SELEX 2</p> <p>keine signifikante Anreicherung</p> | <p>DNA-Bibliothek 2 gegen PrP²⁷⁻³⁰ aus infizierten Hamsterhirn</p> <p>Zentrifugations-assay 10 Runden</p> | | | 4.2.2, 5.2 |
| <p>SELEX 3</p> <p>Selektive RNA-Aptamere gegen Peptid-Epitop 1; Verbesserung der Affinität und Spezifität für PrP-Oligomere</p> | <p>RNA-Bibliothek 3 gegen konformationsspezifische Epitope (Peptid 1 bzw. Peptid 2)</p> <p>Immobilisierte Peptide an magnetischen Partikeln 10 Runden</p> | <p>Peptid 1: K_D (Peptid 1) = 19 nM K_D (Oligomer) = 0,8 μM K_D (PrP^C) = 1,6 μM Faktor: 2</p> <p>Peptid 2: keine signifikante Anreicherung nach 10 Runden</p> | <p>✓</p> <p>Motive 3-2, 3-6 verkürzte Varianten: S3-20_V1, S3-20_V2</p> | 4.2.3, 5.3 |
| <p>SELEX 4</p> <p>Ausblick</p> | <p>RNA-Bibliothek 3 gegen <i>in vitro</i> aggregierte PrP-Oligomere</p> <p>Filterbindungs-assay 11 Runden</p> | <p>K_D (Oligomer) = 0,64 μM K_D (PrP^C) = 2,0 μM Faktor: 3</p> | <p>✓</p> <p>Motive 4-1, 4-2</p> | 4.2.4, 5.4 |
| <p>selektierte Aptamere als Grundlage für verbesserte Affinität und Spezifität für PrP^{Sc} durch <i>in vitro</i> Evolution und / oder multivalente-Aptamer-Strategien</p> | | | | |

Abbildung 5-1: Übersicht der verwendeten Selektionsstrategien zur Isolierung von PrP^{Sc}-spezifischen Aptameren.

Allerdings konnte innerhalb von 15 Selektionsrunden keine signifikante Anreicherung der RNA-Bibliothek festgestellt werden.

Wegen des biologischen Ursprungs des Targets, das direkt aus infizierten Hamsterhirnen aufgereinigt wurde, war in der isolierten Fraktion eine Kontamination mit RNasen vorhanden. Mit Hilfe des Zusatzes von RNase-Inhibitor konnte ein Abbau der RNA-Bibliothek verhindert werden. Jedoch könnte diese zusätzliche Komponente die Selektion negativ beeinflussen oder die RNA-Protein-Bindung inhibieren (Hino, 2002). Desweiteren könnte die Stringenz der Selektionsbedingungen durch die Gegenselektion gerade in den ersten Runden zu hoch gewesen sein, so dass keine ausreichende Bindung erfolgen konnte oder gleich im ersten Selektionszyklus funktionelle Binder verloren gingen. Es wäre auch möglich, dass sich in der verwendeten Ausgangsbibliothek durch Zufall keine affinen Moleküle speziell für dieses Target befanden. In einer anderen Teilmenge der Ausgangsbibliothek wären möglicherweise affine Binder aufzufinden gewesen. (vgl. Burgstaller und Famulok, 1994; Lauhon und Szostak, 1995).

Um die oben erwähnten Probleme auszuschließen, wurde eine weitere *in vitro* Selektion (SELEX 2) gegen isoliertes PrP²⁷⁻³⁰ mit leicht verändertem Selektionsprotokoll ohne Gegenselektion durchgeführt. Durch die Verwendung einer DNA-Bibliothek wurde ein Abbau der Nucleinsäuremoleküle ausgeschlossen und der Einsatz von zusätzlichen Komponenten während der Selektion wie RNase-Inhibitor vermieden. Diese Bibliothek enthielt einen randomisierten Bereich von 50 Nucleotiden und besaß eine Komplexität von $3 * 10^{14}$ verschiedenen Molekülen. Jedoch konnte auch hier keine Anreicherung der Bibliothek mit spezifischen Bindern für PrP²⁷⁻³⁰ erzielt werden. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Bibliotheken (RNA- bzw. DNA-Bibliothek) ist eine unzureichende Komplexität des Ausgangspools höchst unwahrscheinlich. Auch die Stringenz und Verluste der Pool-Komplexität durch Verdau kommen als Grund für die fehlende Anreicherung nicht in Frage. Eine Erklärung könnte die Inhomogenität des Targets sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei dem in der Selektion verwendeten pathogenen Material nicht um die erwarteten Fibrillen handelt, sondern vielmehr um undefinierte heterogene Aggregate, wodurch zum einen die Oberfläche des Targets verringert und zum anderen mögliche Bindungsstellen verdeckt oder maskiert werden können. Außerdem handelt es sich bei der isolierten pathogenen Fraktion lediglich um eine Anreicherung des infektiösen Materials. Verunreinigungen von anderen Proteinen wie Collagen wurden ebenso in der Fraktion gefunden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Fibrillen von einem symmetrischen Aufbau ausgegangen, für die es zahlreiche Hinweise aus

der Literatur gibt (Goevarts *et al.*, 2004; DeMarco *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002; Diringer *et al.*, 1997; Prusiner *et al.*, 1983). Für die *in vitro* Selektion ist die Kenntnis der Struktur nicht erforderlich, jedoch sind die Homogenität und die Reinheit des Targets ein wichtiger und kritischer Aspekt für den Erfolg des Experiments. Das Zielmolekül sollte so rein wie möglich und biochemisch gut definiert sein (Vörtler und Milovnikova, 2005). Ist das Protein nicht homogen, werden in jeder Selektionsrunde andere Epitope präsentiert und deshalb auch andere affine RNA bzw. DNA-Moleküle selektiert.

5.3 Selektion gegen konformationsspezifische Epitope

Da das verwendete PrP²⁷⁻³⁰ für eine *in vitro* Selektion aus den oben aufgeführten Gründen nicht geeignet war, wurde eine weitere Selektionsstrategie verwendet: der Einsatz von konformationsspezifischen Epitopen in Form von Peptid-Targets (SELEX3).

Es ist seit langem bekannt, dass Antikörper bestimmte Oberflächenstrukturen (Epitope) ihres Antigens erkennen können. Peptid-Strategien, in denen das Epitop durch Peptide nachgebildet wurde, führten zu Anti-Protein Antikörpern (Lerner, 1984; Rowlands, 1992; van Regenmortel; 1992, Paramithiotis *et al.*, 2003). In der Literatur sind außerdem viele Beispiele beschrieben, in denen Anti-Peptid Aptamere selektiert wurden, die in der Lage waren das gesamte Protein zu erkennen, das die Peptidsequenz als Epitop enthielt (Proske *et al.*, 2002a; Xu und Ellington, 1996; Blind *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2000; Purschke *et al.*, 2006). Xu und Ellington (1996) generierten beispielsweise ein Aptamer gegen ein 16 Aminosäure langes sogenanntes Arginin-reiches Motif (ARM) des HIV-*rev* Proteins. Dieses Aptamer konnte auch erfolgreich - wie mittels Gelretardationsassay nachgewiesen - das gesamte *rev* Protein erkennen.

Durch die Auswahl geeigneter Epitope kann eine Unterscheidung zwischen der pathogenen und der zellulären Konformation des Prionproteins getroffen werden. Für diese Studie wurde erstens ein Peptid (Peptid 1) ausgewählt, das aus wiederholten YYR-Motiven besteht und zweitens ein Peptid (Peptid 2) verwendet, das sich über die Aminosäurereste 136-158 der Prionproteinsequenz aus Goldhamster erstreckt. Das Peptid 1 leitet sich von der Sequenz ab, die Paramithiotis *et al.* (2003) zur Gewinnung der PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper verwendet haben. Unter Bedingungen, die eine β -Faltblattstruktur des Prionproteins fördern, geht die Konversion des Proteins mit einer erhöhten Zugänglichkeit der Tyrosinreste einher, die ein PrP^{Sc} konformationsspezifisches Epitop bilden (Novitskaya *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2004). Das Peptid 2 deckt eine Region des Prionproteins ab, in der sich die α -Helix 1 befindet, von der eine Beteiligung an der Umfaltung sowie der Aggregation vermutet wird. Diese Sequenz

bildet ebenfalls ein konformationsspezifisches Epitop, da es in PrP^C maskiert, aber in PrP^{Sc} zugänglich vorliegt.

Beide eingesetzten Peptide wurden über einen biotinylierten Linker an Streptavidin beschichtete magnetische Partikel immobilisiert. Die Isolierung des RNA-Peptid-Komplexes wurde mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes, das die magnetischen Partikel vom Überstand trennte, ermöglicht. Beide *in vitro* Selektionen gegen das Peptid 1 bzw. Peptid 2 wurden parallel durchgeführt. RNA-Bibliotheken mit einem randomisierten Bereich von 60 Nucleotiden und einer Komplexität von $8 * 10^{14}$ Teilchen kamen zum Einsatz.

Nach neun Selektionsrunden konnten in beiden SELEX-Experimenten eine Anreicherung von RNA an das Target festgestellt werden. Im Gegensatz zu der Selektion gegen das Peptid 1 sind bei der Selektion gegen das Peptid 2 nur Matrix-Binder isoliert worden. Die unzureichende Isolierung von spezifischen Bindern ist wahrscheinlich auf die hohe Flexibilität des Targets zurückzuführen. Im Allgemeinen existiert von Peptiden in Lösung ein Gleichgewicht zahlreicher Konformationen (Rizo und Gierasch, 1992). Damit ein stabiler Komplex zwischen dem RNA-Ligand und seinem Target gebildet wird, muss der Energiegewinn der Komplexbildung den Entropieverlust kompensieren. Der Energiegewinn ergibt sich aus der Interaktion der RNA-Moleküle mit der Oberfläche des Targets. Durch die hohe Flexibilität des Peptids bei geringer Oberfläche ist der Entropieverlust wahrscheinlich zu hoch, als dass spezifische Binder selektiert werden konnten. Dieses Problem lässt sich vielleicht durch die Wahl von Bedingungen umgehen, in denen das Peptid verminderte Bewegungsfreiheiten hat, z.B. bei niedrigeren Temperaturen.

Gegen das Peptid 1 konnte nach sieben Selektionsrunden eine erste Anreicherung der Bibliothek festgestellt und nach neun Runden 7,4 % der eingesetzten Ribonucleinsäuren eluiert werden. In einer weiteren Runde konnte die Anreicherung nicht gesteigert werden, jedoch wurden trotzdem die PCR-Produkte der 10. Selektionsrunde für die Klonierung ausgewählt. Die Moleküle, die zuerst in einer SELEX isoliert werden, sind nicht notwendigerweise die besten Binder sein, weshalb nach dem ersten Anstieg weitere Runden durchgeführt werden sollten, um komplexeren funktionellen Molekülen eine Anreicherung zu ermöglichen (de Zwart *et al.*, 2005).

Ausgewählte Sequenzen der SELEX 3 wurden auf Peptid 1-bindende Eigenschaften mit Hilfe von SPA (*Scintillation-Proximity-Assay*)- und Filterbindungsassay untersucht. Die Aptamere weisen eine hohe Selektivität und Spezifität gegenüber ihrem Target auf. Es konnte keine Affinität der Aptamere für die Matrix des Bindungsassays, Streptavidin, BSA oder Peptid 2 beobachtet werden. Die unselektierte Bibliothek zeigte keine Affinität für das Target.

Dissoziationskonstanten im Bereich von 19 – 148 nM wurden mittels *Surface-Plasmon-Resonance* (SPR) -Technologie ermittelt. Für die besten Binder S3-7 und S3-20 konnten Dissoziationskonstanten von 22 nM bzw. 19 nM bestimmt werden. Die Aptamere weisen zu ihrem Peptid-Target eine hohe Affinität auf, die in der Größenordnung bereits beschriebener Aptamer-Peptid-Systemen liegt. Zum Beispiel bindet das Aptamer gegen Substanz P mit einem K_D von 190 nM an sein Target (Nieuwlandt *et al.*, 1995), das anti-HIV-1-Rev-Peptid-Aptamer mit einem K_D von 20 - 480 nM (Xu und Ellington, 1996; Bayer *et al.*, 2005), das anti-Neuropeptid Y-Aptamer mit 370 nM (Poske *et al.*, 2002b) und das anti-Vasopressin-Aptamer mit 0,6 nM (Purschke *et al.*, 2006).

Aufgrund kombinierter Vergleiche der Primär- und Sekundärstrukturen der Aptamere konnten verschiedene Bindungsmotive definiert werden. Bei den Aptameren S3-7, S3-69 und S3-89 wurde ein gemeinsames 14 Nucleotide-langes Motiv 3-2 identifiziert. Die Nucleotide GCU bzw. GAU aus diesem Motiv bilden mit vier Nucleotiden der Region des Forward-Primers (UUGG) einen inneren Loop. Die Wahrscheinlichkeit in einem Pool mit 60 randomisierten Nucleotiden zufällig identische Sequenzabschnitte von 14 zusammenhängenden Positionen zu selektieren, die zusätzlich noch eine konservierte Struktur ausbilden, ist sehr gering. Deshalb kann von dem Vorliegen eines Bindungsmotivs ausgegangen werden. Bei dem Aptamer S3-89 ist dieses Motiv allerdings an einer entscheidenden Stelle mutiert, so dass das erste U-Nucleotid der UUGG-Sequenz nicht einzelsträngig, sondern gepaart vorliegt. Das Bindungsmotiv kann somit nicht vollständig ausgebildet werden. Dies könnte der Grund für eine verminderte Affinität des Aptamers S3-89 für das Peptid 1 sein. Während die Bindungskonstanten der Aptamere S3-7 und S3-69 mit 22 nM bzw. 29 nM nahezu gleich sind, liegt der K_D für das Aptamer S3-89 bei 148 nM. Dieses Ergebnis bestätigt, wie wichtig die korrekte Ausbildung des inneren Loops für die Bindung an das Peptid 1 ist.

Ein weiteres Motiv 3-6 wurde bei den Aptameren S3-7 und S3-10 gefunden, das einen terminalen Loop in der Sekundärstruktur formt. Diese Sequenz scheint allerdings eine geringere Affinität für das Peptid 1 aufzuweisen, da das Aptamer S3-10 um einen Faktor 7 schwächer an das Target bindet als Aptamer S3-7, das außer dem Motiv 3-6 auch das Motiv 3-2 beinhaltet.

Für die Aptamere S3-20, S3-88 und S3-131 konnten keine gemeinsamen Bindungsmotive bestimmt werden. Wegen der geringen Größe und der Flexibilität des Targets muss ein Aptamer ein stabiles Gerüst um das unstrukturierte Peptid formen. Nucleotide des Bindungsmotivs sind nicht nur für die Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen wichtig, sondern auch, um die korrekte Konformation der Bindungsstelle zu definieren

(Leulliot and Varani, 2001). Für die Ausbildung dieser komplexen Strukturen sind größere Bindungsmotive des Aptamers notwendig als z. B. für die Bindung an ein Protein. Durch einfache Primär- und Sekundärstrukturanalyse ist es problematisch diese komplexen Motive zu erkennen, so dass weitere experimentelle Analysen notwendig werden.

Aus den Informationen von Verkürzungsstudien und Strukturanalysen konnte für das Aptamer S3-20 ein minimales Bindungsmotiv bestimmt werden, das aus zwei Hairpin-Strukturen besteht. Die Affinität für das Peptid konnte im Fall des verkürzten Derivates S3-20_V2 beibehalten und im Fall von S3-20_V1 sogar erhöht werden. Die Bindungstasche wird durch einen Doppelstrang stabilisiert, wobei die Länge der Helix essentiell für die Bindungsaffinität des Aptamers ist. Während bei dem verkürzten Aptamer S3-20_V2 die stabilisierende Helix nur aus sieben Basenpaaren besteht, wird sie bei der Variante S3-20_V1 aus zehn Basenpaaren gebildet. Die Reduktion der Helix in S3-20_V2 führt zu einer Verminderung der Affinität, so dass sich vermuten lässt, dass der Helixstamm eine entscheidende Rolle bei der korrekten Ausbildung des Bindungsmotivs spielt.

Die Vielzahl an verschiedenen Bindungsmotiven deutet auf eine hohe Pool-Komplexität zu Beginn der Selektion hin. Für ein Target wurden gleich mehrere gänzlich unterschiedliche Bindungsmotive generiert. Dennoch konnte bei keinem der Motive eine Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen Aptameren gegen das Prionprotein festgestellt werden. Einige PrP-Aptamere bilden sehr komplexe Strukturen aus und falten sich in ein G-Quartett-Motiv (Proske *et al.*, 2002a; Weiss *et al.*, 1997), während andere Prionprotein-spezifische Aptamere eher unstrukturiert sind und große einzelsträngige Bereiche aufweisen, die nur durch geringe Anteile an Helices stabilisiert werden (Takemura *et al.*, 2006; Sayer *et al.*, 2004).

5.3.1 Affinität für PrP-Oligomere

Nach der Strategie dieser Selektion sollten die Peptid-bindenden Aptamere in der Lage sein, an die pathogene Form des Prionproteins zu binden. Die Affinität des Aptamers S3-20 für *in vitro* aggregierte lösliche PrP-Oligomere, die als Modell für PrP^{Sc} dienten, wurde in Bindungsassays eine Dissoziationskonstante von 800 nM bestimmt. Diese Bindung ist im Vergleich zu der Bindung an das Peptid (19 nM) deutlich schwächer.

Bei den in der Literatur beschriebenen Epitop-Strategien geht der Transfer von anti-Peptid-Aptameren auf das Protein, von dessen Sequenz das Peptid abgeleitet worden war, auch mit einer Abnahme der Affinität einher. Purschke *et al.* (2006) selektierten ein DNA-Spiegelmer gegen eine 25 Aminosäure lange Domäne des *Staphylococcus* Enterotoxin B und erhielten

eine Bindungskonstante von 200 nM für das Peptid. Durch Biacore-Messungen wurde eine Affinität des Spiegelmers an das gesamte Protein mit einem K_D von 420 nM bestimmt.

Zusätzlich zu den notwendigerweise unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der Bindungskonstanten, gibt es für die verringerte Affinität der Aptamere zu dem Protein mehrere potentielle Erklärungen: Erstens kann das adressierte Epitop im Zusammenhang des Proteins eine andere Konformation einnehmen als das Peptid in Lösung und wird deshalb nicht mehr von dem Aptamer erkannt. Zweitens kann das Epitop in dem Protein maskiert vorliegen, so dass es für das Aptamer nicht zugänglich ist. Drittens könnte das Aptamer wegen seiner stabilen und sperrigen Struktur nicht ungehindert in die räumliche Nähe des Targets gelangen.

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid entspricht nicht einer Domäne oder einem Sequenzabschnitt des Proteins, sondern einem diskontinuierlichen konformationsspezifischen Epitop. In der zellulären Prionprotein-Konformation liegt das Epitop unzugänglich und unzusammenhängend in verschiedenen Bereichen des Proteins vor. Erst nach der Umfaltung des Prionproteins in die pathogene Konformation sollten die einzelnen Abschnitte auf der Oberfläche des Proteins ein zugängliches Epitop bilden. Die genaue Form und Lage des Epitops sind allerdings nicht bekannt. Es ist möglich, dass die Konformation des Peptids im Kontext des Proteins verändert wird, so dass das Peptid-bindende Aptamer eine schwächere Wechselwirkung mit dem Protein eingeht.

Als zweite Möglichkeit kommt in Betracht, dass das Epitop in der fehlgefalteten Form des Prionproteins für das Aptamer nicht zugänglich ist. Bis heute ist eine Strukturanalyse von PrP^{Sc} nicht gelungen und es existieren lediglich Modelle für pathogene Fibrillen. Obwohl viele Hinweise in der Literatur eine Konformationsveränderung in der adressierten Region belegen und das Epitop sorgfältig ausgesucht wurde (siehe 4.2.3), begründet sich die Auswahl auf Hypothesen. Eine Maskierung des Epitops in PrP^{Sc} ist deshalb nicht auszuschließen. Dagegen spricht die erfolgreiche Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen das Tyr-Tyr-Arg-Motif, die das Epitop in PrP^{Sc} erkennen konnten (Paramithiotis *et al.*, 2003). Dieser indirekte Beweis deutet auf die Zugänglichkeit des Epitops in der pathogenen Konformation hin.

Als dritter Grund für die Verminderung der Affinität des Aptamers an PrP^{Sc} ist die sterische Hinderung zu nennen. Wie bereits erwähnt, ist der größte Unterschied einer Selektion gegen ein kleines Molekül verglichen mit der gegen ein Protein, dass die resultierenden Aptamere das kleine Target umschließen und ein stabiles Gerüst ausbilden (Eulberg *et al.*, 2005b). Die potentielle Oberfläche eines Peptids für Bindungen ist sehr gering, gepaart mit hoher

Flexibilität, so dass Aptamere gegen Peptide in der Regel eine komplexe dreidimensionale Struktur formen müssen, um eine ausreichend hohe Affinität zu gewährleisten. Sowohl natürliche als auch *in vitro* selektierte Aptamere besitzen häufig in freier Form eine andere Struktur als in gebundener (Hermann und Patel, 2000; Tang und Breaker, 1997; Winkler *et al.*, 2002; Robertson und Ellington, 1999; Leulliot und Varani, 2001). Durch einen *induced-fit*-Mechanismus wird die Konformation des Aptamers verändert, so dass eine optimale Bindung an das Target gewährleistet wird. Es gibt allerdings Beispiele, bei denen die kompakte Struktur von Aptameren bei den Zielmolekülen eine Konformationsänderung erzwingt (Frankel und Smith, 1998; Ye *et al.*, 1999). Eine hohe strukturelle Stabilität der hier selektierten Aptamere könnte zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung an das im Protein vorliegende Zielseptid führen.

5.3.2 Spezifität

Obwohl eine Bindung der Aptamere an die PrP-Oligomere erreicht werden konnte, war die erzielte Spezifität nicht zufrieden stellend. Mittels Bindungsassays wurde die Affinität des Aptamers S3-20 für PrP^C mit einer Dissoziationskonstante von 1,6 μ M bestimmt. Das Aptamer ist zwar in der Lage zwischen den beiden Isoformen zu unterscheiden, allerdings nur mit einem Diskriminierungsfaktor von zwei.

Ein Grund für die geringe Spezifität des Aptamers könnte die Eigenschaft des Prionproteins sein, Nucleinsäuren unspezifisch zu binden. Der positiv geladene N-terminale Bereich des Prionproteins scheint für Wechselwirkungen mit dem negativen Rückgrad der Nucleinsäuren verantwortlich zu sein (Grossmann *et al.*, 2003), aber auch die hydrophobe Region, die die Aminosäuren 106-126 enthält (Nandi *et al.*, 2002), und das verkürzte Fragment 121-231 binden an Nucleinsäuren (Nandi, 1998). Rhie *et al.* (2003) verwendeten als Kontrolle für ihr Aptamer SAF-93 ein Streptavidin-bindendes Aptamer, für das Dissoziationskonstanten mittels Bindungsassay von 2 μ M an die α -Form des gesamten Prionproteins (23-231) und von 312 nM an die β -Form ermittelt wurden. Diese Bindungskonstanten entsprechen denen für das Aptamer S3-20 in dieser Studie. Für die unselektierte Ausgangsbibliothek wurden ähnliche Bindungskonstanten wie für das Aptamer S3-20 gegen PrP^C bzw. PrP-Oligomere gemessen, so dass von einer unspezifischen Bindung an das Prionprotein ausgegangen werden kann.

Eine weitere mögliche Erklärung für die mangelnde Spezifität der selektierten Peptid-Aptamere könnte in der Ausbildung stabiler Nucleinsäure-PrP^C-Komplexe liegen. Biochemische und biophysikalische Studien zeigten, dass sowohl lange (> 900 bp) als auch

kurze (< 30 bp) doppelsträngige DNA *in vitro* eine strukturelle Umwandlung des Prionproteins und seine Aggregation in Oligomere, Amyloide und stabile Nucleinsäure-Protein Komplexe induzieren (Nandi und Leclerc, 1999; Cordeiro *et al.*, 2001). Diese Aggregate waren teilweise gegen Proteinase K-Verdau resistent und wiesen einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf. Elektronenmikroskopische Aufnahmen unterstrichen die Ähnlichkeit der Morphologie der durch DNA induzierten Amyloide mit den isolierten PrP^{Sc}-Fibrillen aus infiziertem Gehirnmateriale. Es wurden auch PrP-Amyloide in Gegenwart von einzelsträngigem polyA und tRNAs nachgewiesen (Nandi und Nicole, 2004). Adler *et al.* (2003) zeigten durch Gelretardation, dass kleine strukturierte RNA-Moleküle (shRNAs) in der Lage sind, mehrere Prionproteine zu binden und einen stabilen Nucleoprotein-Komplex zu bilden. Für die Herstellung Proteinase-resistenter Aggregate musste jedoch Serum anwesend sein, so dass wahrscheinlich eine weitere unbekannte Komponente (Faktor X) für die Umwandlung in resistentes PrP^{Sc} notwendig war. Eine Studie von Deleault *et al.* (2003) lieferte hingegen Hinweise für eine unmittelbare Funktion von Nucleinsäuren bei der Pathogenese der TSE-Krankheiten. PrP^{Sc} kann *in vitro* in Gegenwart von PrP^C und Hirnhomogenat mittels PMCA (*Protein-Misfolding Cyclic Amplification*, Saborio *et al.*, 2001) amplifiziert werden. Die Anwesenheit von RNasen, die einzelsträngige RNA abbauen, verhinderte die Amplifikation von PrP^{Sc}, während die erneute Zugabe von RNA die Vermehrung von PrP^{Sc} förderte (Deleault *et al.*, 2003). Doppelsträngige RNA, DNA oder RNA-DNA Hybride hatten dagegen keine Auswirkungen auf die Amplifikationsrate von PrP^{Sc}. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei dem unbekanntem Faktor X um einzelsträngige RNA handelt, die als Katalysator und / oder als Chaperon an der strukturellen Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} und somit an der Prion-Pathogenese beteiligt ist (Nandi *et al.*, 2002; Nandi, 2004).

Biophysikalische Messungen in dieser Arbeit verdeutlichen, dass schon geringe Konzentrationen an RNA ausreichen, um einen Verlust des α -helikalen Bereichs und eine Umfaltung von PrP^C zu induzieren. DLS-Messungen bestätigten die Bildung von Oligomeren und Aggregaten des Prionproteins unmittelbar nach Zugabe der RNA. Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass sich die gebildeten RNA-PrP^C Komplexe durch kurze Zentrifugation pelletieren lassen. In diesen Aggregaten sind die Nucleinsäuren eingeschlossen und werden so aus dem Gleichgewicht zwischen den freien Komponenten und dem Komplex in Lösung entfernt. Die Bindung eines Aptamers an sein Target kann als Gleichgewichtszustand zwischen den frei vorliegenden Komponenten und dem Aptamer-Target Komplex betrachtet

werden. Eine scheinbare hohe Affinität einer unspezifischen Bindung an PrP^C kann durch die Bildung der Aggregate suggeriert werden.

5.4 Selektion gegen PrP-Oligomere

Parallel zum experimentellen Fortschreiten der vorliegenden Arbeit mehrten sich in der Literatur die Hinweise, dass ausgebildete Fibrillen nicht die neurotoxische Spezies sind, sondern vielmehr kleinere Oligomere und lösliche Aggregationsintermediate des Prionproteins (Hill und Collinge, 2003). In anderen Amyloid-Krankheiten wurden bereits ähnliche Mechanismen für die Neurotoxizität beschrieben (Caughey, 2005). So werden für die Alzheimerkrankheit lösliche Amyloid-Oligomere (Kayed *et al.*, 2003) und für die Transthyretinamyloidose (TTR) Monomere oder nicht-native Oligomere (Reixach *et al.*, 2004) als toxisch beschrieben. Sogar Fragmente von Proteinen, die überhaupt nicht mit einer neurodegenerativen Erkrankung assoziiert sind, wie die SH3-Domäne der Phosphatidylinositol-3'-Kinase oder der Aminoterminus des HypF-Proteins, können auf Zellen in frühen Stadien der Aggregation toxisch wirken (Bucciantini *et al.*, 2002). Bei der Huntingtons-Krankheit wurde festgestellt, dass die geformten Aggregate, die sich in *inclusion bodies* ansammeln, nicht zytotoxisch sind, sondern im Gegenteil das Risiko des Zelltodes minimieren (Arrasate *et al.*, 2004).

Toxizität und Infektiösität von PrP^{Sc} müssen nicht notwendigerweise gekoppelt sein (Chesebro *et al.*, 2005; Fioriti *et al.*, 2005). In manchen Fällen von Prionenkrankheiten erscheinen nur sehr geringe oder gar keine nachweisbaren Mengen an abgelagerten PrP^{Sc} (Hsiao und Prusiner, 1990; Medori *et al.*, 1992; Budka *et al.*, 1997). Kontroverserweise liegen in anderen Patienten große Mengen an Ablagerungen vor, allerdings ohne klinische Symptome (Hill *et al.*, 2000; Hörnlimann, Riesner, Kretzschmar, 2001; Mallucci *et al.*, 2003). Außerdem ist PrP^{Sc} nicht direkt neurotoxisch, wenn kein PrP^C in den Zellen exprimiert wird (Brandner *et al.*, 1996; Bueler *et al.*, 1992).

Für die Toxizität von PrP^{Sc} scheint nicht nur die zelluläre Form des Prionproteins eine unbedingte Voraussetzung zu sein, sondern auch dessen Verankerung in der Zellmembran mittels des GPI-Ankers. Chesebro *et al.* (2005) entwickelten transgene Mäuse, die PrP^C ohne GPI-Anker herstellten. Wurden diese Mäuse mit *scrapie* infiziert, wurde PrP^{Sc} produziert, das aber zu keinen klinischen Symptomen führte. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass ein Peptid, die Aminosäurereste 106-126 umfassend, toxisch auf Nervenzellen wirkte, aber keine Anzeichen von Infektiösität zeigte (Forloni *et al.*, 1993; Fioriti *et al.*, 2005). Die

Zerkleinerung von PrP^{Sc} durch Ultraschall bewirkt auch eine höhere Infektiösität und Amplifikation der infektiösen Partikel (Saborio et al., 2001; Gabizon *et al.*, 1987).

Schließlich konnten Silveira *et al.* (2005) die am meisten infektiösen Prionenpartikel identifizieren. PrP^{Sc} wurde teilweise disaggregiert, fraktioniert und auf Infektivität in Bioassays getestet. Sphärische bis elliptische Partikel mit einem Durchmesser von ungefähr 17-27 nm, das einer Masse von 14-28 monomeren Prionproteinen entspricht, wurden als die effizientesten Initiatoren der Krankheit charakterisiert.

Deshalb wurden für eine weitere SELEX *in vitro* aggregierte PrP-Oligomere als Target verwendet, die möglicherweise eine Zwischenstufe auf den Weg zu den Prion-Fibrillen darstellen (Redecke *et al.*, Manuskript eingereicht). Hauptvorteile dieser Oligomere sind ihre Löslichkeit und Stabilität. Sie lassen sich eindeutig biochemisch charakterisieren und in hoher Reinheit reproduzierbar herstellen. Probleme, die sich aus dem Peptid-Ansatz ergeben haben, können hier vermieden werden und damit sollten sich Aptamere mit einer höheren Affinität und Spezifität für PrP^{Sc} generieren lassen.

Für diese *in vitro* Selektion (SELEX 4) wurde eine RNA-Bibliothek mit einer Zufallssequenz aus 40 Nucleotiden und einer Komplexität von $1,5 * 10^{15}$ Teilchen verwendet. Die Selektion erfolgte unter stringenten Bedingungen mit Hilfe von Nitrozellulosemembranen. Innerhalb von 13 Zyklen konnte die Bibliothek erfolgreich auf 8,5 % affiner RNA-Binder angereichert werden. Trotz Präselektion gegen die Nitrozellulosefilter und stringenten Waschbedingungen, konnte ein simultaner Anstieg an Matrixbindern zu den affinen Aptameren nicht vermieden werden. Für die Klonierung wurden die PCR-Produkte der 11. Selektionsrunde ausgewählt, weil hier das Verhältnis von Matrixbindern zu affinen Bindern noch gering war.

Insgesamt 28 Klone wurden sequenziert und anschließend Primär- und Sekundärstrukturanalysen unterzogen. Drei konservierte Sequenzen konnten als mögliche Bindungsmotive identifiziert werden. Die beiden Motive 4-1 und 4-2 sind in über der Hälfte aller analysierten Sequenzen zu finden und ähneln sich sehr stark. Sie bestehen hauptsächlich aus G- und A-Nucleotiden, wobei die Guanosine teilweise als Duplett, Triplet oder Quartett vorliegen. In der Sekundärstruktur nehmen diese 14 bzw. 11 Nucleotide langen Motive einen großen einzelsträngigen Bereich ein, der entweder einen terminalen oder einen internen Loop bildet. Stabilisiert werden diese flexiblen Regionen durch eine Helix, die durch Loops, Bulges und Fehlpaarungen unterbrochen sein kann. Ein weiteres Bindungsmotiv 4-3 wurde in nur zwei verschiedenen Sequenzen gefunden. Ein Teil dieses Motiv formt eine Seite eines aus 12 Nucleotiden bestehenden internen Loops, der vermutlich an der Bindung an das Prionprotein beteiligt ist.

Es ist anzumerken, dass im Vergleich mit bereits beschriebenen Aptameren zwar keine konservierten Motive in der Primärstruktur aufzufinden waren, aber die Sekundärstrukturanalysen auffällige Gemeinsamkeiten zeigten. Das Aptamer 60-3 gegen PrP^C besitzt zwei terminale Loops, die einen hohen G- und A-Gehalt aufweisen (Sekiya *et al.*, 2006). Aptamer SAF-93 und seine Verkürzungsvarianten gegen Scrapie-Fibrillen lassen keine ausgeprägte Sekundärstruktur erkennen (Sayer *et al.*, 2004). Der größte Teil der Sequenz liegt einzelsträngig vor, nur Doppelstränge aus 3 bis 5 Basenpaaren scheinen die gesamte Struktur zu stabilisieren. Genauso verhält es sich bei den Anti-PrP^C Aptameren von Takemura *et al.* (2006), die einen hohen Anteil an unstrukturierten und flexiblen Bereichen beinhalten.

Insgesamt zeichnen sich die Sekundärstrukturen durch eine hohe Variabilität durch lineare Bereiche aus, die essentiell für eine hohe Affinität für das Prionprotein zu sein scheint. Die Verformbarkeit der Aptamere durch minimale Sekundärstrukturelemente ermöglicht eine Bindung über eine Konformationsänderung (*induced-fit*), bei dem einzelsträngige Bereiche in der Nähe des Targets eine definierte Konformation für eine optimale Bindung einnehmen (Leulliot und Varani, 2001). Im Gegensatz zu den Aptameren aus der SELEX 3, die eine hohe strukturelle Stabilität aufweisen, können sich die Aptamere der SELEX 4 an ihr Target anpassen. Eine Verringerung der Affinität durch die sterische Hinderung der Aptamere wird somit aufgehoben.

Tatsächlich konnten in *Strataclean*TM Bindungsassays Dissoziationskonstanten für Aptamere der SELEX 4 von 640 nM (S4-19) und 680 nM (S4-23) bestimmt werden, die verglichen mit den Peptid-bindenden Aptameren der SELEX 3 um ein fünftel geringer waren. Die Affinität der anti-Oligomer Aptamere konnte auch im Vergleich zur Kontrolle verbessert werden. Gleichzeitig wurde die Spezifität gegenüber dem PrP-Oligomer erhöht. Einige Aptamere erreichten Diskriminierungsfaktoren zwischen dem PrP-Oligomer und PrP^C von 3-5; Aptamere S4-19 und S4-23, für die Dissoziationskonstanten bestimmt wurden, konnten um einen Faktor 3 zwischen den beiden Prionprotein Isoformen unterscheiden.

Die geringe Anreicherung an affinen Bindern ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Selektionsdruck während der *in vitro* Selektion für die besten Oligomer-Aptamere nicht hoch genug war. Es wurde nur ein sehr geringer Anteil an Target-Bindern von 8,5 % isoliert, wobei sich darunter auch Matrixbinder befanden. Mit stringenteren Selektionsbedingungen wäre es gegebenenfalls möglich, besser bindende Aptamere in höherem Maße anzureichern als es bisher der Fall war. In modifizierten Selektionsprotokollen, wie z.B. dem Wechsel der Matrix, können die Selektionseffizienzen weiterhin verbessert werden. Der hohe Hintergrund an unspezifischen RNA-Bindern an das Prionprotein wird durch Blocken von Bindungsstellen

mit inerter RNA umgehen. Wie bereits beschrieben, ist der Einsatz einer Gegenselektion - in diesem Fall eine Selektion gegen PrP^C - eine effiziente Möglichkeit, um die Spezifität zu dem ausgewählten Target drastisch zu erhöhen.