

## 6 Ausblick

Mit Hilfe der *in vitro* Selektion konnten in dieser Arbeit Aptamere gegen die pathogene Form des Prionproteins generiert werden. Für den Einsatz in diagnostischen Applikationen ist eine Erhöhung der Affinität und der Spezifität der Aptamere allerdings erforderlich. Die Ergebnisse dieser Studie können jedoch als Ausgangspunkt für weitere evolutive Strategien verwendet werden, wodurch die Affinität für PrP<sup>Sc</sup> sowie der Diskriminierungsfaktor verbessert werden sollen.

Ansätze, um die Spezifität durch *in vitro* Evolution weiter zu steigern, wurden bereits mehrfach beschrieben (Wilson und Szostak, 1999; Gold *et al.*, 1995; Osborne und Ellington, 1997). Ein bereits vorselektierter Pool kann zu einem gewissen Prozentsatz mutiert und einer zweiten Selektion gegen das gleiche oder ein anderes Target unterzogen werden, wodurch neue und differenzierte funktionale Eigenschaften entstehen können. Beispielsweise wurde die Affinität gegenüber dem Peptid Vasopressin bzw. dem Coenzym A drastisch erhöht, indem ein teilweise randomisierter Pool, der auf den zuerst isolierten Aptameren basierte, erneut gegen das jeweilige Target selektiert wurde (Williams *et al.*, 1997; Burke und Hoffman, 1998). Meistens genügen schon geringe Mutationen, um vollständig neue Funktionen zu erhalten (Mandal und Breaker, 2004; Huang und Szostak, 2003; Yang *et al.*, 1996; Connell und Yarus, 1994). Aptamere, die im Rahmen dieser Arbeit generiert worden sind, könnten ebenfalls durch Mutation und anschließende Selektion gegen PrP-Oligomere oder natives PrP<sup>Sc</sup> weiter verbessert werden. Sterische Hinderung oder mangelnde Affinität der Anti-Peptid Aptamere würden verringert oder aufgehoben.

Eine weitere Möglichkeit affine Eigenschaften zu erhöhen, liegt in der Entwicklung von multivalenten Aptameren. Durch die Kombination von gleichen oder unterschiedlichen Bindungsmotiven gegen ein Target können die intermolekularen Wechselwirkungen verstärkt und größere Affinitäten erzielt werden (Cassiday und Maher, 2003; Ringquist und Parma, 1998; Di Giusto und King, 2004; Shi *et al.*, 1999; Santulli-Marotto *et al.*, 2003). Angesichts des symmetrischen Aufbaus der Prion-Fibrillen aus gleichen Protein-Bausteinen, könnte die Verknüpfung von Aptameren einen aussichtsreichen Ansatz bieten.

Im Hinblick auf die Ligation zu multivalenten Bindern sollten für die Aptamere gegen das PrP-Oligomer minimale Bindungsmotive charakterisiert werden, um die Größe möglichst gering zu halten. Die Analyse der Sekundärstruktur der Aptamere der SELEX 4 geben erste Ansatzpunkte für Bindungsmotive und Verkürzungsmöglichkeiten.

Weiterhin ist das diagnostische Potential der Aptamere mit verbesserten Eigenschaften bezüglich der Affinität und der Diskriminierung für PrP<sup>Sc</sup> zu untersuchen. Reporter-moleküle für die Detektion oder Modifikationen zur Stabilisierung der RNA-Aptamere können meistens ohne Verlust der Bindungsfunktion während der chemischen Synthese eingeführt werden.

Weltweit sind bisher alle Versuche konformationsspezifische Liganden für eine sensitive TSE-Diagnose zu entwickeln gescheitert. Schwierigkeiten ergeben sich durch das Problem der Unterscheidung ausschließlich durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Prionproteins bei identischer Primärstruktur. Ob eine ausreichende Sensitivität durch Aptamere für die Diagnose erreicht werden kann, bleibt zu klären.

Weitere Bindungsstudien mit unterschiedlichen Isoformen des Prionproteins, z. B. diffusen Plaques oder fibrillären nativen PrP<sup>Sc</sup>, können möglicherweise Aufschluss geben, welche Konformationen durch die Aptamere erkannt werden. Von der Identifizierung der Bindungsstellen der Aptamere auf der Oberfläche des Prionproteins sind neue Einblicke in den Konversionsprozess von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> zu erwarten.

Außerdem ist eine nähere biochemische und biophysikalische Charakterisierung der RNA-PrP<sup>C</sup> Komplexe, die in dieser Studie durch RNA induzierte *in vitro* Aggregation entstanden sind, von Interesse. Aus der Interaktion zwischen Nucleinsäure und Prionprotein lassen sich physiologisch relevante Aspekte ableiten, die in der Prion-Pathogenese eine Rolle spielen könnten. *In vivo* Assays könnten Aussagen über die Neurotoxizität der *in vitro* aggregierten Oligomere geben und die physiologische Relevanz der Nucleinsäuren-PrP-Wechselwirkung aufklären.