7 Zusammenfassung

Unter Prionkrankheiten werden eine Reihe an fatalen, neurodegenerativen Erkrankungen bei Menschen und Tieren wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, BSE oder Scrapie zusammengefasst. Die pathogene Form des Prionproteins (PrP^{Sc}) stellt das infektiöse Agens und den einzigen zurzeit bekannten Marker der Prionkrankheiten dar. PrP^{Sc} entsteht durch die Fehlfaltung und Aggregation des wirtseigenen zellulären Prionproteins (PrP^{C}) und lagert sich in Form von Plaques hauptsächlich im Gehirn ab. Wegen der biochemischen Ähnlichkeit der beiden Prionprotein-Isoformen konnten bisher keine präklinischen Diagnoseassays entwickelt werden, die verlässlich zwischen den Konformationen unterscheiden können.

In dieser Arbeit wurden deshalb drei verschiedene Strategien verfolgt, um PrP^{Sc}-spezifische Aptamere zu generieren: (i) Selektion gegen pathogenes PrP^{27-30}, das aus infizierten Hamsterhirnen isoliert wurde, (ii) Selektion gegen ausgewählte konformationsspezifische Epitope von PrP^{Sc} in Form von Peptid-Targets und (iii) Selektion gegen *in vitro* aggregierte, lösliche PrP-Oligomere.

Natives PrP^{27-30} war wegen seiner Inhomogenität nicht als Target für eine *in vitro* Selektion geeignet. Deshalb wurden Peptide ausgewählt, von denen erwartet wurde, dass sie konformationsspezifische Epitope auf der Oberfläche von PrP^{Sc} abbilden, aber in PrP^{C} maskiert vorliegen. Gegen ein Tyr-Tyr-Arg-Motiv der pathogenen Prionkonformation konnten erfolgreich hochaffine und spezifische RNA-Aptamere selektiert werden. Für diese Aptamere wurden Dissoziationskonstanten für das Peptid im nanomolaren Bereich bestimmt. Durch Primär- und Sekundärstrukturanalysen konnten minimale Bindungsmotive der Aptamere definiert und der beste Binder Aptamer S3-20 so um 40 Nucleotide verkürzt werden, dass die Affinität für das Peptid erhalten blieb. Die Aptamere waren in der Lage an PrP-Oligomere, die als Modell für PrP^{Sc} verwendet wurden, mit einem K_D von 800 nM zu binden und zwischen den beiden Isoformen mit den Faktor von zwei zu unterscheiden.

Um die Spezifität der Aptamere weiter zu verbessern, wurde zusätzlich eine Selektion gegen PrP-Oligomere durchgeführt, wobei neue Aptamere mit einer Bindungskonstante im Bereich von 640-680 nM isoliert werden konnten. Der Diskrimininierungsfaktor konnte auf einen Wert von 5 erhöht werden. Diese isolierten Aptamere können als Ausgangspunkt für weitere *in vitro* Evolutionen dienen, um höhere Affinitäten und Spezifitäten gegen PrP^{Sc} zu erzielen.

Summary

Prions are involved in the pathogenesis of the fatal neurodegenerative disorders called transmissible spongiform encephalopathies (TSE) such as scrapie in sheep, BSE in cattle and Creutzfeldt-Jakob-Disease in humans. The pathogenic form of the prion protein (PrP^{Sc}) represents the infectious agent and the currently only known marker for prion disease. PrP^{Sc} is caused by misfolding and aggregation of the cellular prion protein (PrP^{C}) and it is stored as plaques and prion rods mainly in the brain. Because of the biochemical similarity of the prion protein isoforms, the development of pre-clinical diagnostic tests that could reliably discriminate between the conformations has failed up to date.

In this study, therefore, the following strategies were employed to isolate PrP^{Sc}-specific aptamers by: (i) selection against PrP^{27-30} that was isolated from infected hamster brains, (ii) selection against conformation-specific epitopes by employing a peptide approach and (iii) selection against *in vitro* aggregated, but soluble PrP-oligomers.

It turned out that PrP^{Sc} was no suitable target for *in vitro* selection. This was likely due to its inhomogenity. Consequently, peptides were designed to mimic the conformational epitopes of PrP^{Sc} which are masked in PrP^{C}. Highly affinic and specific aptamers against Tyr-Tyr-Arg-motif of pathogenic prion protein were successfully isolated. The apparent dissociation constants of these aptamers were determined in the nanomolar range. Binding motifs could be defined by using primary and secondary structure analysis. The best binder S3-20 was reduced to the minimal binding motif without loss of affinity. The aptamers were also capable to bind to PrP-oligomers that were used as a model for PrP^{Sc} with a K_d of 800 nM and to discriminate between the two isoforms with a factor of two.

However, the specificity of these aptamers was not satisfactory. Therfore, an additional selection was performed and novel aptamers were raised against PrP-oligomers. These aptamers exhibited dissociation constants in the range of 640-680 nM and the discrimination factor could be enhanced to 3 to 5. These isolated aptamers that will serve as starting point for further cycles of *in vitro* evolution to achieve higher affinity and specificity for PrP^{Sc}.