
2. EINLEITUNG

2.1. Nukleinsäuren

2.1.1. Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Nukleinsäuren gelten als Schlüsselmoleküle des Lebens. Sie sind Träger der genetischen Information und stellen somit das Erbgut eines Organismus dar.

Chemisch betrachtet sind sie Polynukleotide. Sie sind aufgebaut aus heterozyklischen Basen (Purin- oder Pyrimidinderivate), einer Pentose als Kohlenhydratkomponente und einer Phosphatgruppe. Zucker und Phosphatgruppe bilden dabei ein konstantes Rückgrat und damit das strukturelle Gerüst der Nukleinsäuren. Daran sind die verschiedenen Basen als Informationsträger und variabler Teil der Nukleinsäuren befestigt. Je nach Art des Zuckers wird unterschieden zwischen:

- a) Desoxyribonukleinsäuren (DNA oder DNS), mit 2-Desoxyribose als Kohlenhydratbaustein, und
- b) Ribonukleinsäuren (RNA oder RNS), die als Zuckerkomponente die Ribose enthalten.

Die Purinbasen sind sowohl bei der RNA als auch bei der DNA Adenin (A) und Guanin (G). Die Pyrimidinbasen der DNA sind Thymin (T) und Cytosin (C), die der RNA dagegen Uracil (U) und Cytosin (Abb. 1).

Dieser rein chemischen Unterscheidung zwischen den beiden Nukleinsäurearten entsprechen ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen. Die Desoxyribonukleinsäuren bilden die Chromosomen, auf denen die Gene eines Organismus liegen. Die Ribonukleinsäuren hingegen sind unmittelbar an der Biosynthese der Proteine beteiligt. Man unterteilt sie je nach ihrer Aufgabe in verschiedene Klassen. Die drei bekanntesten RNA-Klassen sind die Messenger-RNA (mRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA).

1869 entdeckte Miescher die Nukleinsäuren in Lymphozyten, die aus Eiter gewonnen wurden. Die biologische Bedeutung der Nukleinsäuren blieb jedoch lange Zeit unbekannt. Erst 1944 erbrachte Avery durch Transformationsexperimente den Beweis für ihre genetische Funktion (Avery *et al.*, 1944). 1953 fanden dann Watson und Crick im Prinzip der Basenpaarung den Schlüssel zur Informationsweitergabe (Watson & Crick, 1953) (Abb. 1).

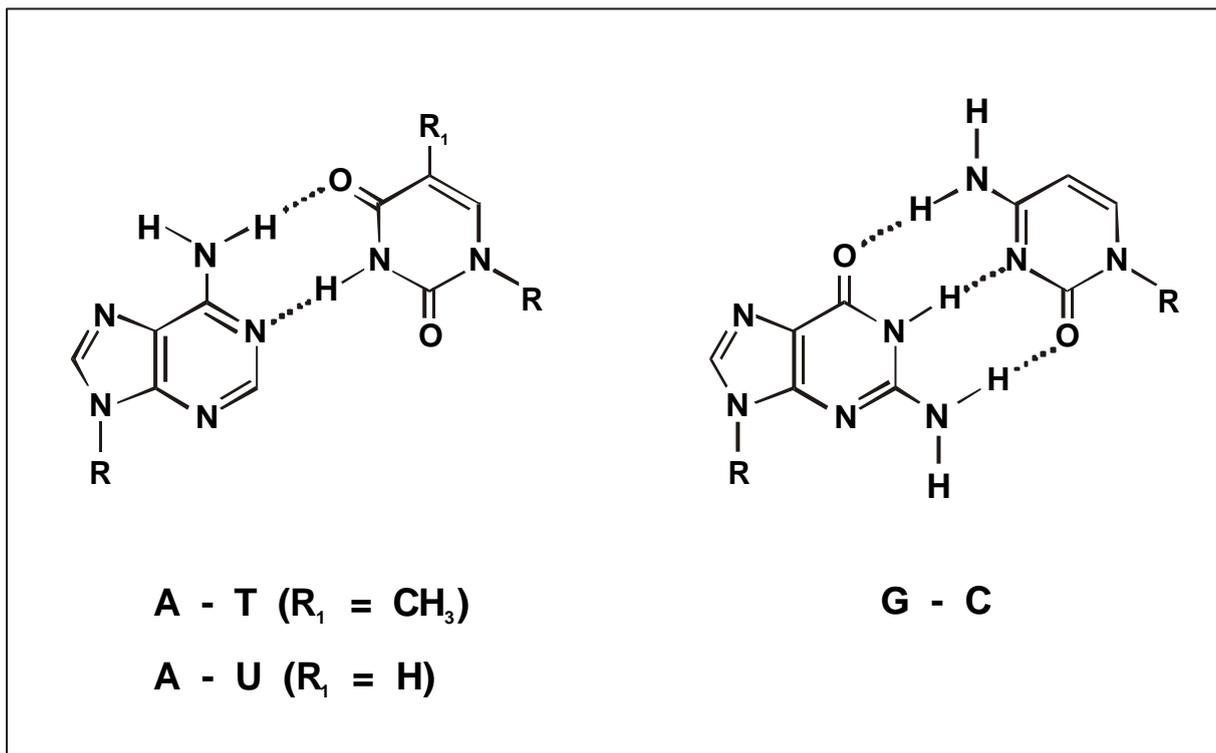


Abbildung 1: Watson-Crick Basenpaarung. Die Basenpaare werden durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen A und T bzw. U und durch drei Wasserstoffbrücken zwischen G und C geformt.

Jede Base bestimmt eindeutig ihren gegenüberliegenden Partner und legt damit die Basenfolge im neu synthetisierten Strang fest. Die Aneinanderlagerung von zwei Nukleinsäuresträngen durch Paarung zueinander gehöriger (komplementärer) Basen führt zur Raumstruktur der Doppelhelix. Die Basenpaarung erlaubt die Aufstellung von Grundregeln der Informationsübertragung in allen lebenden Zellen. Diese werden auch als „zentrales Dogma der Molekularbiologie“ bezeichnet (Abb. 2).

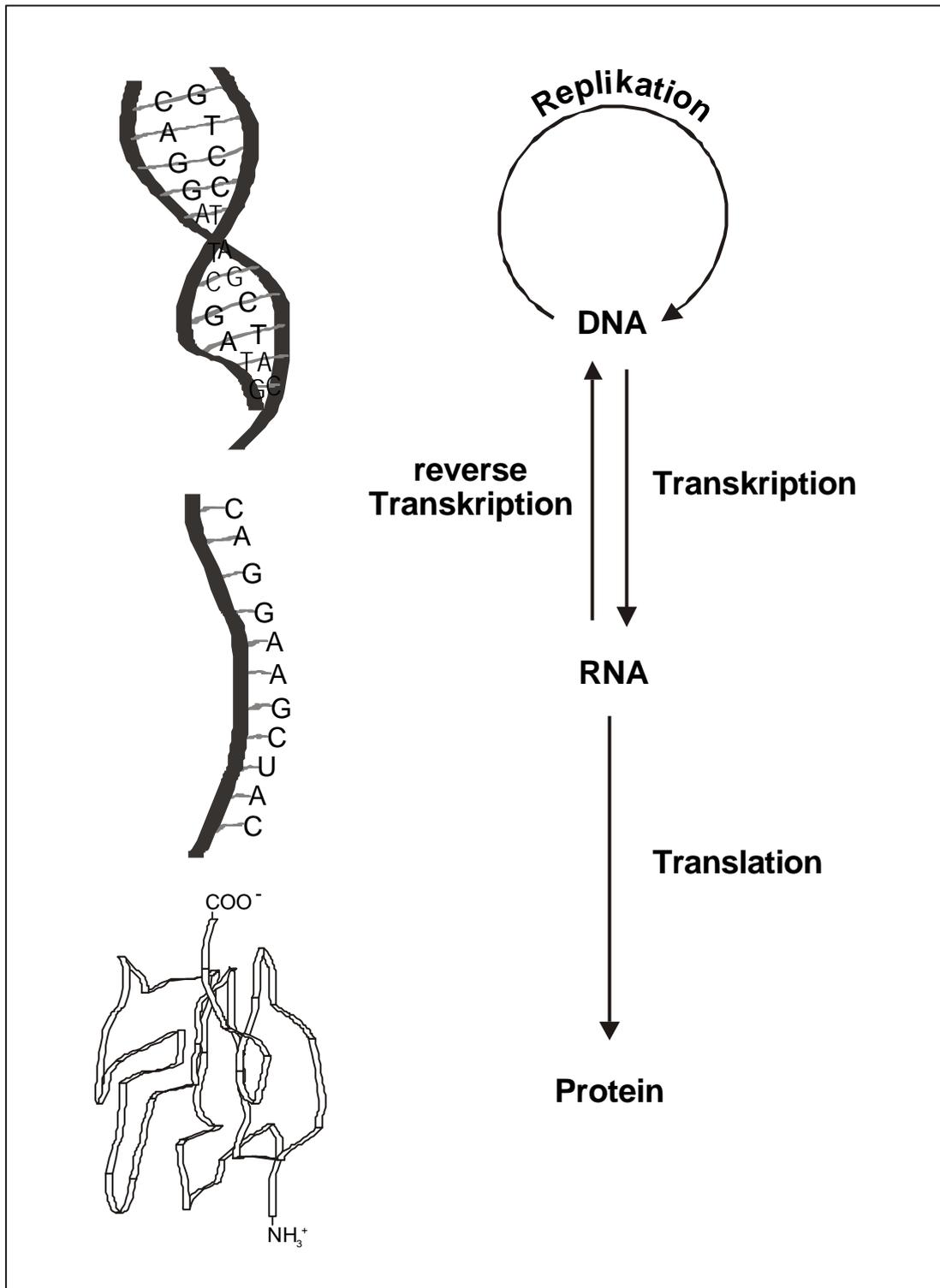


Abbildung 2: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie. Die DNA kann ihre Information durch Replikation vervielfältigen. DNA und RNA werden durch Transkription bzw. reverse Transkription ineinander umgeschrieben. Der Informationsfluß zwischen RNA und Protein verläuft ausschließlich in Richtung Protein. Dieser Prozeß wird als Translation bezeichnet.

Die genetische Information ist in der DNA als Abfolge der Basen enthalten und wird durch ein Alphabet der vier Buchstaben A, G, C und T beschrieben. Durch die eindeutige Bestimmung der komplementären Basen kann die Basensequenz beliebig übertragen und weitergegeben werden. Dadurch besitzen Nukleinsäuren die Fähigkeit zur identischen Replikation. Gleichzeitig legt die genetische Information auch die Aminosäuresequenz von Proteinen fest. Diese ist in einem Code verschlüsselt, bei dem eine Folge von drei Basen für eine bestimmte Aminosäure steht. Mittlersubstanz zwischen DNA und Protein ist hierbei eine informationstragende RNA, die als Boten-RNA oder auch als Messenger-RNA (mRNA) bezeichnet wird. Der Informationsfluß zwischen DNA und RNA kann in beide Richtungen erfolgen. Die Informationsweitergabe zwischen RNA und Protein hingegen verläuft ausschließlich in Richtung des Proteins.

2.1.2. Ribonukleinsäuren

Wie bereits beschrieben, unterscheidet man zwischen drei Hauptgruppen von Ribonukleinsäuren, der mRNA, der rRNA und der tRNA. Neben diesen drei Gruppen sind unter anderem noch die Vorläufer der mRNA (prä-mRNA), kleinere Kern-RNA-Arten („small nuclear RNA“, snRNA) (Guthrie & Patterson, 1988; Reddy & Bush, 1988) und katalysierende RNAs (Ribozyme) (Kruger *et al.*, 1982; Guerriere-Takada, 1983) zu erwähnen, auf deren Funktion hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Die mRNA übernimmt die Funktion der Informationsweitergabe, wie es im zentralen Dogma der Molekularbiologie beschrieben ist. In einigen Organismen, wie z. B. den Retroviren, dient die Messenger-RNA auch direkt als Genom.

Die DNA als Träger der genetischen Information wird in mRNA transkribiert. Anschließend findet an den Ribosomen die Translation statt, bei der die Information der mRNA in eine Aminosäuresequenz und somit in ein Protein übersetzt wird.

Bei der Translation ist die Transfer-RNA neben mehreren Proteinen und Cofaktoren von wesentlicher Bedeutung. Die tRNA weist eine Kleeblattstruktur auf, die an ihrer 3'-terminalen Ribose mit einer aktivierten Aminosäure beladen werden kann. Nach der Beladung spricht man von Aminoacyl-tRNAs. An der mittleren Schleife ihrer Kleeblattstruktur (Anticodon-Schleife) weisen diese eine für die jeweilige Aminosäure spezifische Sequenz von drei

Nukleotiden (Anticodon) auf. Dieses Basentriplett kann mit dem entsprechenden Codon der mRNA in Basenpaarung treten und vermittelt auf diese Weise die Übersetzung von Basensequenz zu Aminosäuresequenz. Die Translation findet an den Ribosomen (großen Ribonukleoproteinen) statt.

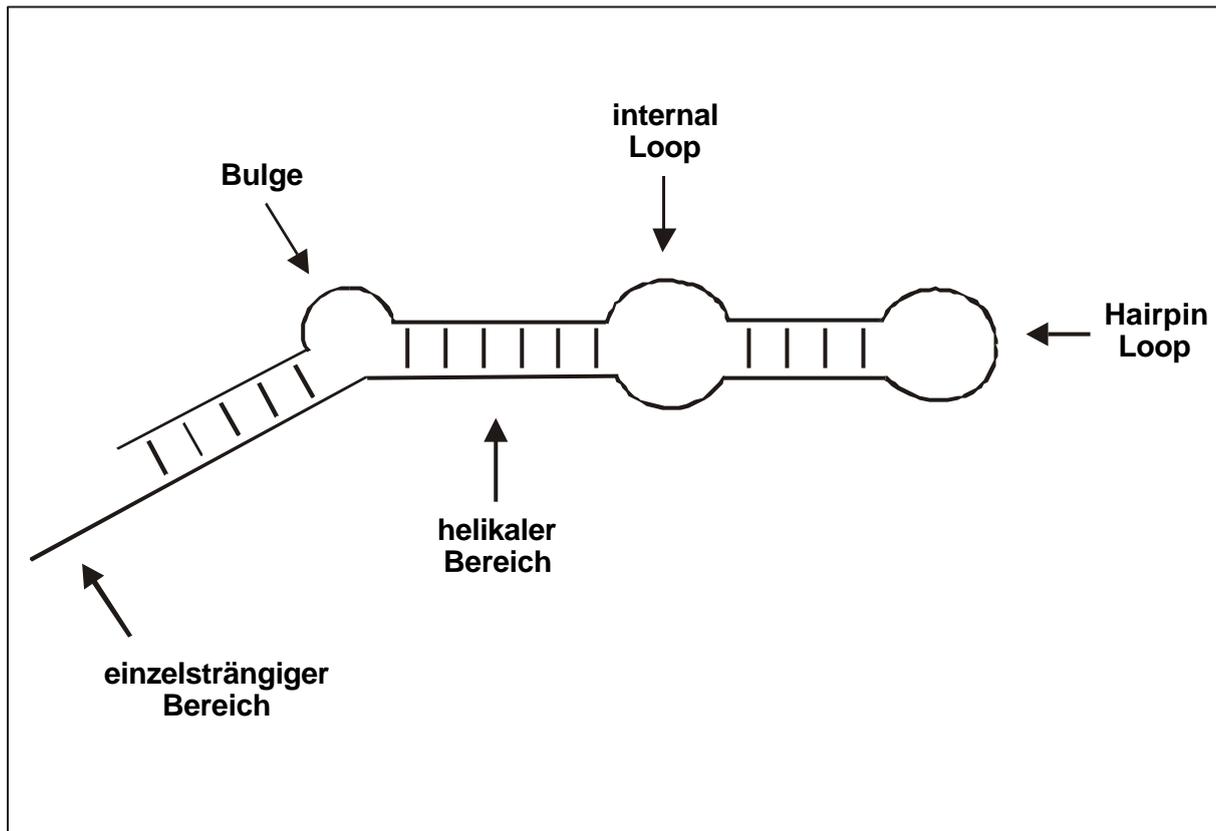


Abbildung 3: Beispiel für die Ausbildung der Sekundärstruktur einer Ribonukleinsäure. Durch Faltung eines RNA-Stranges bei der Aneinanderlagerung von komplementären Bereichen kann das Molekül verschiedene Sekundärstrukturen annehmen.

Die ribosomalen RNAs sind strukturelle und funktionelle Komponenten der Ribosomen. Ribosomen bestehen aus je zwei Untereinheiten, die aufgrund ihrer Sedimentationsrate in einer Zentrifuge und damit nach ihrer Molekülgröße unterteilt werden. Prokaryontische Ribosomen werden als 70S Ribosomen bezeichnet und bestehen aus einer 50S und einer 30S Untereinheit. Während in der 50S Untereinheit 23S und 5S RNAs zu finden sind, enthält die 30S Untereinheit eine einzelne 16S RNA. Eukaryontische Ribosomen sind ähnlich aufgebaut, jedoch als 80S Ribosomen etwas größer.

Ribonukleinsäuren sind unverzweigte Polymere und treten, mit Ausnahme weniger viraler RNAs, einzelsträngig auf. Trotzdem können sich durch die Faltung eines einzelnen RNA-Stranges bei intermolekularer Basenpaarung komplementärer Bereiche regional helikale Strukturen ausbilden. Die Faltung eines Ribonukleinsäurestranges hat Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des Moleküls. Es können helikale Bereiche, Schleifen am Ende einer Hairpinstruktur (hairpin-loops), schleifenartigen Ausbuchtungen in doppelsträngigen Bereichen (bulges und internal loops) (Abb. 3) und Pseudoknoten entstehen.

2.2. Die RNA-Welt

Die Bezeichnung RNA-Welt bezog sich ursprünglich auf eine Zeit im Laufe der Evolution früher Lebensformen, in der es die aufwendigen Mechanismen der Proteinbiosynthese, so wie wir sie heute kennen, noch nicht gab. Man nahm stattdessen an, daß die RNA das eigentliche lebenspendende Molekül war. Bereits vor mehr als 30 Jahren kamen erste Vermutungen auf, daß es damals RNAs mit katalytischen Eigenschaften gegeben haben muß (Woese, 1967; Orgel, 1968), aber erst mit der Entdeckung katalytischer RNAs in heutigen Organismen, der sogenannten Ribozyme oder auch Riboenzyme, (Kruger *et al.*, 1982; Guerriere-Takada, 1983) wurde erneut über die Rolle der RNA bei der Entstehung des Lebens diskutiert (Pace & Marsh, 1985; Lewin, 1986; Gilbert, 1986). Diese „Evolutionstheorie“ wurde durchaus auch kritisch betrachtet, wie man z. B. aus den 1987 erschienenen Veröffentlichungen von Brenner & Ellington sowie von Maizel & Weiner ersehen kann (Brenner & Ellington, 1987; Maizel & Weiner, 1987).

Die unterschiedlichen Hypothesen zu einer solchen RNA-Welt basieren dabei im wesentlichen auf drei grundsätzlichen Thesen:

1. Während der Evolution des Lebens gab es einen Zeitraum, in dem die genetische Kontinuität durch Replikation von RNA sichergestellt wurde.
2. Die Watson-Crick Basenpaarung war der Schlüssel zur Replikation.
3. Genetisch codierte Proteine waren nicht als Katalysatoren an der Replikation beteiligt.

Verstärkte Forschung auf dem Gebiet der Ribonukleinsäuren im letzten Jahrzehnt zeigte die Vielfalt der Bedeutung dieser Moleküle. Neben ihren biologischen Funktionen bei der Proteinbiosynthese, im Bereich des Editings (Cattaneo, 1991; Blum *et al.*; 1990) und des Splicings (Altman, 1989; Cech, 1992) oder als Genom in Retroviren (Ganem & Varmus, 1987; Gallo, 1987) wurde man auch auf die Bedeutung ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften aufmerksam. Man stellte fest, daß kleinere RNA-Moleküle leichter in der Lage sind, ausgeprägte und relativ stabile Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden als Polypeptide (Gold *et al.*, 1993). Diese Beobachtung, sowie die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologien in den siebziger Jahren und der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) durch Mullis in den achtziger Jahren, ermöglichte die Suche nach Ribonukleinsäuren, die ganz bestimmte Eigenschaften aufweisen. Zu diesen Eigenschaften zählt z. B. die Fähigkeit zur Bindung bestimmter Substanzen (Tuerk & Gold, 1990; Ellington & Szostak 1990) und zur Diskriminierung zwischen Substanzen ähnlicher Struktur (Jenison *et al.*, 1994). Es wurden auch Ribonukleinsäuren gefunden, die bestimmte chemische oder biochemische Prozesse katalysieren können (Beaudry & Joyce, 1992; Chapman & Szostak, 1994; Burgstaller & Famulok, 1995).

In Abbildung 4 werden einige Theorien und Entdeckungen, die mit der Entwicklung der Hypothese über eine mögliche RNA Welt in Zusammenhang stehen, in zeitlichem Zusammenhang dargestellt.

bis ins 19. Jahrhundert	Jede Kultur hat ihre eigenen Mythen, zum Ursprung menschlichen Lebens. Auch vermutet man eine spontane Entwicklung des Lebens aus totem Material.
1864	L. Pasteur weist nach, daß aus Flüssigkeiten, die zum Abtöten von Mikroorganismen gekocht und anschließend steril aufbewahrt werden, kein Leben erwächst.
1924	A. Oparin behauptet, daß einfache einzellige Lebensformen aus „frühatmosphärischen“, anorganischen Molekülen entstanden sind (Wasserstoff, Ammoniak, Methan, Kohlendioxid, Wasser und Stickstoff).
1929	J. Haldane unterstützt die von Oparin postulierte These, setzt jedoch die Einwirkung von Energie aus atmosphärischer UV-Strahlung und Hitze voraus.
1953	S. Miller stellt das „frühatmosphärische“ Gasgemisch her und setzt es eine Woche lang elektrischer Spannung aus. Hierbei entstanden u. a. Aminosäuren. J. Watson & F. Crick zeigen die Struktur der DNA Helix. (Watson & Crick, 1953)
1961	M. Nirenberg & J. Mattaei finden heraus, daß eine nur aus Uracil bestehende mRNA in Phenylalanin übersetzt werden kann. (Nirenberg & Mattaei, 1961)
1962	J. Watson & F. Crick erhalten einen Nobelpreis für ihre Arbeit zur Aufklärung der DNA Struktur.
1968	F. Crick und L. Orgel postulieren RNA als ersten Informationsträger (Crick, 1968; Orgel, 1968).
1972	H. Noller & J. Chaires stellen eine Theorie über die Funktion der rRNA im Translationsprozeß von mRNA in Protein auf. (Noller & Chaires, 1972)
1976	G. Quigley & A. Rich zeigen eine 3-dimensionale tRNA-Struktur (Quigley & Rich, 1976)
1982	T. Cech <i>et al.</i> entdecken katalytische RNAs in heutigen Organismen (Kruger <i>et al.</i> , 1982).
1986	W. Gilbert benutzt den Begriff der „RNA-Welt“, um eine Zeit zu beschreiben, in der die RNA das erste informationstragende und katalytische Molekül darstellte. (Gilbert, 1986) K. Mullis stellt die PCR als Methode zur schnellen Vervielfältigung von DNA und RNA Sequenzen vor. (Mullis <i>et al.</i> , 1986)
1989	T. Cech & S. Altman erhalten einen Nobelpreis für die Entdeckung katalytischer RNAs. J. Doudna & J. Szostak legen Nachweise für eine selbstreplizierende RNA vor (Doudna & Szostak, 1989). G. Joyce beschreibt einen Zyklus zur <i>in vitro</i> -Evolution katalytischer RNAs (Joyce, 1989).
1990	C. Tuerk & L. Gold, sowie A. Ellington & J. Szostak entwickeln unabhängig voneinander Methoden zur <i>in vitro</i> -Evolution von RNAs mit Hilfe der PCR. (Tuerk & Gold, 1990; Ellington & Szostak, 1990) R. Robertson & G. Joyce entwickeln ein ssDNA-spaltendes Ribozym durch <i>in vitro</i> -Evolution (Robertson & Joyce, 1990).
1992	H. Noller <i>et al.</i> weisen die Rolle der rRNA bei der Proteinbiosynthese nach (Noller <i>et al.</i> , 1992).
1993	K. Mullis bekommt einen Nobelpreis für Entwicklung der PCR.
1996	J.P. Fürste <i>et al.</i> entwickeln das Spiegel-Design als Methode zur <i>in vitro</i> -Evolution hochaffiner L-Nukleinsäuren (Klußmann <i>et al.</i> , 1996; Nolte <i>et al.</i> , 1996).
1998	K. Watanabe <i>et al.</i> zeigen, daß Fragmente einer 23S rRNA in der Lage sind Peptidbindungen zu knüpfen (Nitta <i>et al.</i> , 1998).

Abbildung 4: Chronologie einer hypothetischen RNA Welt.

2.3. *In vitro*-Evolution von Nukleinsäuren durch SELEX

SELEX steht als Kurzform für Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (Tuerk & Gold, 1990). Die Methode berücksichtigt die drei wesentlichen Merkmale der Evolution: die Modifikation (Mutation), die Selektion und die Amplifikation. Hinter dem Verfahren zur *in vitro*-Evolution von Nukleinsäuren steht die Überlegung aus großen kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken, die Nukleinsäuren heraus zu picken, die an ein bestimmtes Zielmolekül binden. Diese Bibliotheken stellt man durch chemische Synthese einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäuren mit randomisierten Bereichen her.

Durch wiederholtes Durchlaufen eines SELEX Zyklus (Abb. 5) sollen bindende Sequenzen, die eine hohe Affinität zum Target aufweisen, von denen getrennt werden, deren Affinitäten niedriger sind (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990). Der Vorteil, den die Nukleinsäurebibliotheken gegenüber anderen Substanzbibliotheken haben (z. B. Peptid- oder Antikörperbibliotheken), liegt darin, daß Nukleinsäuren sowohl geno- als auch phänotypische Eigenschaften in einem Molekül vereinigen. Sie bilden also nicht nur eine bestimmte dreidimensionale Struktur aus („Aussehen“ des Moleküls = Phänotyp), sondern sie codieren sich auch selbst (Träger der genetischen Information = Genotyp). Durch die Ausbildung verschiedener Faltmotive, wie z. B. Hairpinstrukturen, Loops, Bulges und Pseudoknoten, ergeben sich stabile intramolekulare Strukturen, die es den Nukleinsäuren erlauben, mit anderen Molekülen in spezifische Wechselwirkungen zu treten.

Kombinatorische Oligonukleotidbibliotheken können basierend auf verschiedenen Überlegungen synthetisiert werden:

- Randomisierung kleinerer Bereiche:
Werden in einem bereits bekannten Molekül nur bestimmte, oft sehr kleine Regionen randomisiert, so will man auf diese Art Moleküle erhalten, die eine ähnliche dreidimensionale Struktur besitzen wie das Ursprungsmolekül. In diesem Fall entstehen kleinere Bibliotheken, mit deren Hilfe entweder die Bindungs- oder die katalytischen Eigenschaften des Oligomers verbessert oder aber Aussagen über das aktive Zentrum der Nukleinsäure getroffen werden sollen.
- Randomisierung größerer Regionen
Wird eine größere Region in der Nukleinsäure randomisiert, wie es meist bei der Suche nach Liganden gegen neue Targets Substanzen gemacht wird, so sind nur die beiden End-

bereiche der Nukleinsäuren konstant. Diese konstanten Bereiche dienen als Primer für die PCR und als Promotor für die T7 Transkription. Sowohl die PCR als auch die T7 Transkription sind zur Vervielfältigung des Ausgangspools und der angereicherten Nukleinsäurepools aus den einzelnen Selektionsrunden notwendig. Der gesamte Bereich zwischen den Fixregionen, meist zwischen 30 und 70 Nukleotiden, wird randomisiert.

Bei der Synthese randomisierter Bereiche ist die Wahrscheinlichkeit für jede der vier Basen, während der chemischen Synthese an einer bestimmten Position in der Nukleinsäure gekoppelt zu werden, gleich groß. Die theoretische Poolkomplexität des synthetisierten Ausgangspools liegt damit bei 4^x verschiedenen Molekülen, wobei x für die Anzahl der randomisierten Positionen in der jeweiligen Sequenz steht. Experimentell wird jedoch gerade bei großen Bibliotheken die Komplexität des Pools durch die Synthesekapazität begrenzt. Üblicherweise werden dabei Bibliotheksgrößen von 10^{12} bis 10^{18} verschiedenen Molekülen erreicht (Joyce, 1994).

Das SELEX Verfahren ist eine zyklische Methode (Abb.5). Nach der chemischen Synthese eines Ausgangspools einzelsträngiger DNA (ssDNA), die einen randomisierten Bereich enthält, wird dieser durch eine präparative PCR vervielfältigt. Es folgt die Übersetzung der DNA in RNA mittels T7 Transkription. Jetzt liegt ein RNA Startpool für die erste SELEX Runde vor. Der Startpool wird in Bindungspuffer gelöst und über eine ausschließlich Trägermaterial enthaltende Vorsäule geschickt. Dabei werden die Sequenzen, die eine hohe Affinität zum Säulenmaterial aufweisen, vom Nukleinsäurepool abgetrennt. Anschließend findet die erste Affinitätselution statt. Die RNAs werden dazu auf die Hauptsäule gegeben, an der die Targets substanz direkt oder über ein Spacermolekül immobilisiert ist. Nichtbindende Ribonukleinsäuren werden bei der Affinitätselution von bindenden RNA-Molekülen getrennt. Die selektierten Sequenzen werden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann mittels PCR vervielfältigt. Nach erneuter T7 Transkription liegt schließlich ein mit bindenden Sequenzen angereicherter RNA Pool vor, der als Ausgangspool für die folgende SELEX Runde dient (Abb. 5). Nach erfolgreicher Selektion wird der durch PCR erhaltene cDNA-Pool kloniert, sequenziert und charakterisiert.

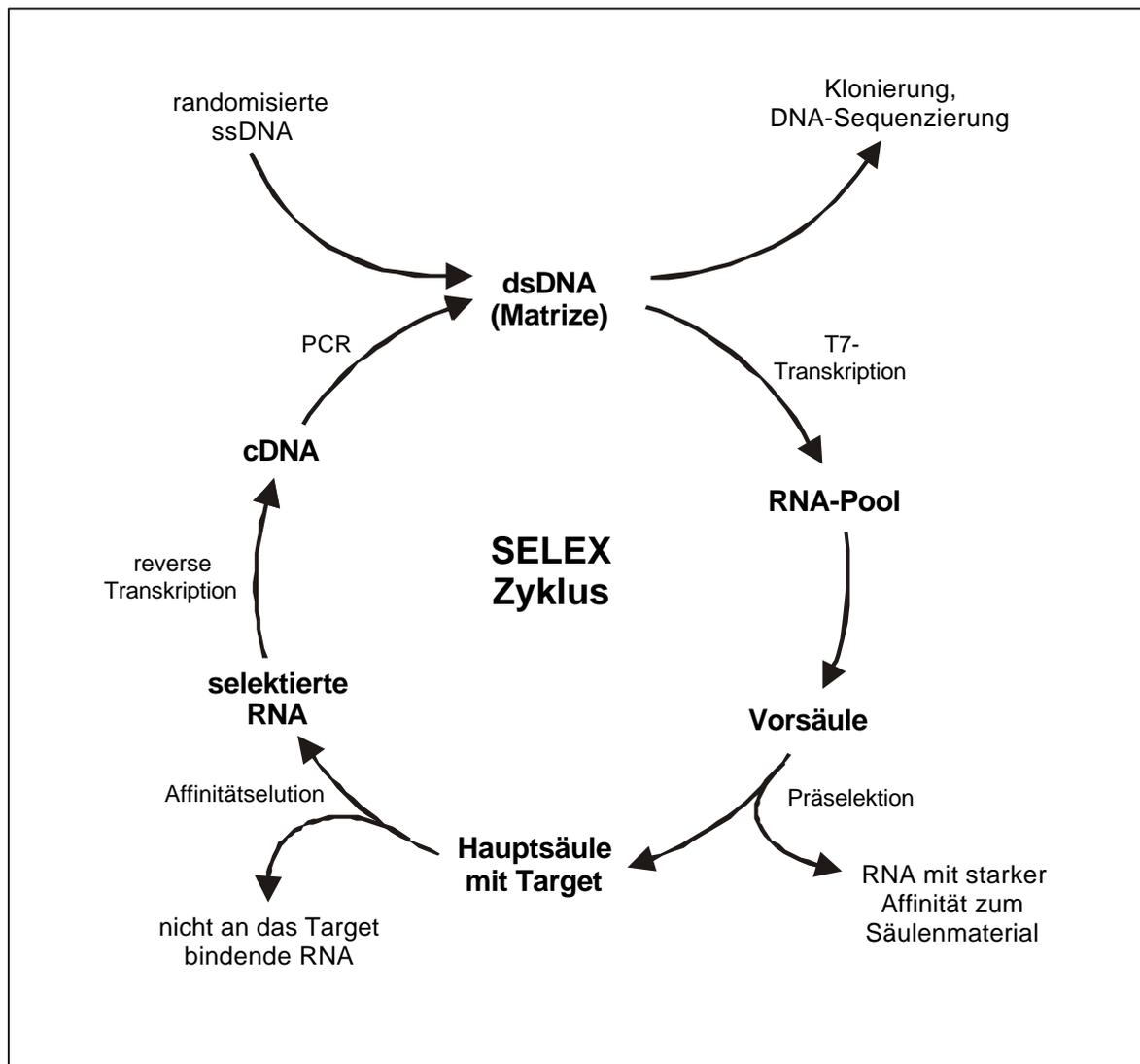


Abbildung 5: Allgemeines Schema zum SELEX-Protokoll. Anhand einer chemisch synthetisierten DNA-Bibliothek wird über mehrere enzymatische Schritte eine RNA-Bibliothek erstellt, aus der in einem zyklischen Verfahren Moleküle mit hoher Affinität zum am Säulenmaterial gekoppelten Zielmolekül selektiert werden.

In den letzten Jahren wurden mit diesem Verfahren eine Vielzahl von Liganden gegen die unterschiedlichsten Targetmoleküle gefunden. Die Moleküle, gegen die bei der *in vitro*-Evolution Nukleinsäureliganden gesucht wurden, gehörten dabei den unterschiedlichsten Substanzgruppen an. Es wurden Liganden entwickelt, die an kleine polare Strukturen, wie z. B. an Purin- oder Xanthinderivate (Sassanfar & Szostak, 1993; Kiga *et al.*, 1998; Jenison *et al.*, 1994; Burke & Gold, 1997), an Chloramphenicol (Burke *et al.*, 1997) oder an Aminosäuren (Connell *et al.*, 1997) binden. Auch für größere polare Moleküle, wie den Aminoglycosidantibiotika Tobramycin (Wang & Rando, 1995), Kanamycin A, Lividomycin

(Lato *et al.*, 1995), und Neomycin (Wallis *et al.*, 1995; Famulok & Huettendorfer, 1996), dem Peptidantibiotikum Viomycin (Wallis *et al.*, 1997), organischen Farbstoffen (Ellington & Szostak, 1990; Lorsch & Szostak, 1994) oder Peptiden (Nieuwlandt *et al.*, 1995; De Beuckeleer, 1998) wurden hochaffine Nukleinsäuren gefunden. Bei den Makromolekülen, für die man mit Hilfe des SELEX-Protokolls bindende Oligonukleotide entdeckt hat, sind unter anderem ein hydrophobes farnesyliertes Protein (Gilbert *et al.*, 1997) und verschiedene Virusproteine (Jensen *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1996) zu erwähnen. Die hochaffinen Oligonukleotide, die auch als Aptamere, Liganden oder Binder bezeichnet werden, weisen dabei Dissoziationskonstanten im milli- bis picomolaren Bereich auf.

Die Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur ermöglicht es dem Nukleinsäureliganden, durch elektrostatische und van der Waals'sche Wechselwirkungen mit dem Target sowie durch Bildung von Wasserstoffbrücken auch kleinere Unterschiede in der chemischen Struktur sich ähnelnder Moleküle festzustellen. Dadurch ist die hochaffine Nukleinsäure auch in der Lage, zwischen solchen Substanzen zu diskriminieren. Durch negative Selektion (counter selection) kann die Selektivität der Nukleinsäureliganden stark erhöht werden (Jenison *et al.*, 1994). Hierbei werden einem bereits stark angereicherten Liganden-Pool Strukturen angeboten, die eine starke Verwandtschaft zum Targetmolekül aufweisen. Nukleinsäuren, die an diese Strukturen binden, werden dadurch aus dem Pool entfernt. Im Pool verbleiben nur die Sequenzen, die an das Target, nicht aber an seinen „Nachahmer“, binden. Man kennt inzwischen hochaffine Nukleinsäuren, die zwischen Theophyllin und Coffein (Jenison *et al.*, 1994), zwischen Arginin und Citrullin (Yang *et al.*, 1996), zwischen D- und L-Arginin (Nolte *et al.*, 1996) und zwischen D- und L-Adenosin (Klußmann *et al.*, 1996, Klußmann, 1996) unterscheiden können. Diese Eigenschaft macht die hochaffinen Nukleinsäureliganden zu einer interessanten Substanzgruppe für therapeutische und diagnostische Anwendungen.

2.4. *In vitro*-Evolution von Antikörpern oder Peptiden

Durch das Prinzip des Phagen Displays, das die Antigenerkennung durch Antikörper mit der Replikation von Phagen kombiniert, können Antikörper unter Umgehung des Immunsystems und, falls erwünscht, auch ohne vorhergehenden Immunisierungsprozeß vollständig einer *in vitro*-Evolution unterzogen werden (Abb. 6). Es ist möglich, die Affinität und Spezifität eines Antikörpers mit dieser Methode zu optimieren.

Als Phagen oder auch Bakteriophagen werden bakterienspezifische Viren bezeichnet. Für das Verfahren des Phagen Displays wird die codierende Sequenz der variablen Region des Antikörpers (V-Gen) mit dem Gen des Phagen Minor-Coat-Proteins pIII fusioniert. Die Expression dieses Fusionsproduktes und die dadurch hervorgerufene Einbindung des Antikörpers in die fertige Phagenhülle hat zur Folge, daß der Antikörper auf der Außenseite der Phagenhülle präsent ist, während sich sein genetisches Material im Inneren des Phagen befindet. Genotyp und Phänotyp des jeweiligen Antikörpers sind somit im Phagen vereinigt, was eine spezifische Anreicherung von antigenspezifischen Antikörperphagen ermöglicht. Phagen, die einen Antikörper exprimieren haben, der an das Zielmolekül bindet, bleiben an einer Oberfläche, die mit dem Antigen beschichtet ist, haften. Nichtbindende Exemplare können hingegen abgespült werden. Die auf diese Weise selektierten Binder können anschließend samt der kodierenden Phagen von der Oberfläche abgetrennt und in Bakterien eingeschleust werden, um sich dort für weitere Selektionsrunden oder für Bindungsstudien zu vermehren.

Der Erfolg des Antikörper Phagen Displays hängt von der Kombination dieser Display- und Anreicherungsverfahren mit einer möglichst großen Bibliothek an Antikörper kodierenden V-Genen ab. Die eingesetzten V-Gene stammen dabei direkt aus Stammzellen und werden dann kloniert und rearrangiert. Diese Bibliotheken werden dann als synthetisch naiv bezeichnet (Hoogenboom, 1997, Clackson & Wells, 1994). Eine weitere Methode zur Erstellung einer V-Gen-Bibliothek ist die Klonierung von rearrangierter IgM V-Genen aus B-Zellen. Mit dieser Methode werden natürliche naive Bibliotheken erhalten. Für immunisierte Bibliotheken werden die V-Gene aus Plasmazellen nach Immunisierung gewonnen. Mit dieser dritten Methode der *in vitro*-Evolution hochaffiner Antikörper wurden unter anderem bereits antivirale Antikörper (Barbas & Burton, 1996) sowie Antikörper gegen Doxorubicin und Estradiol (Vaughan *et al.*, 1996) mit Affinitäten im nano- und picomolaren Bereich selektiert.

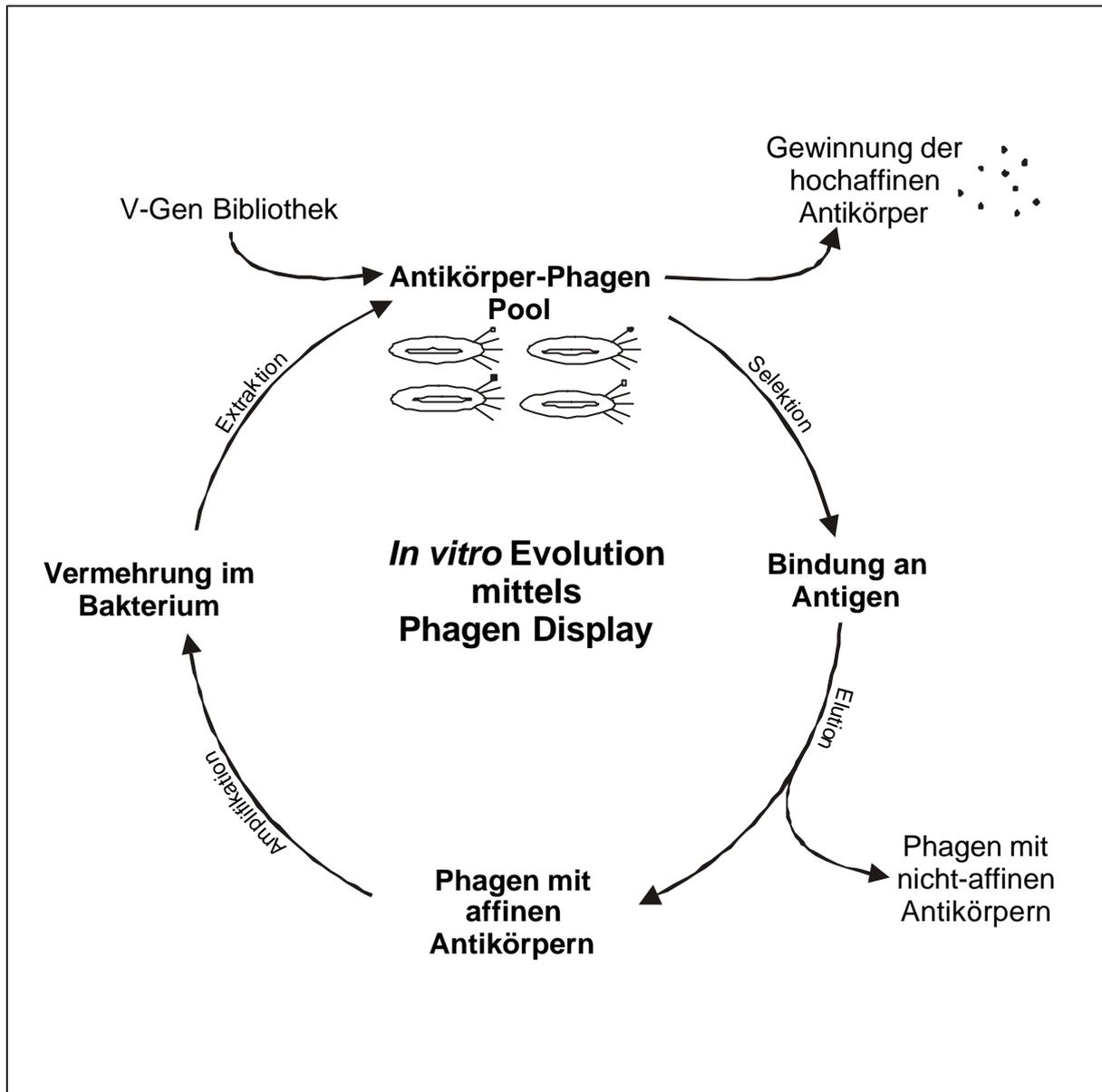


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *in vitro*-Evolution von Antikörpern mit der Methode des Phagen Displays. Ausgehend von einer V-Gen-Bibliothek wird ein Pool von Phagen, die Antikörper an ihrer Außenseite exprimieren, erstellt. Dieser Phagenpool wird mit Antigenen in Kontakt gebracht. Bei der nachfolgenden Affinitätselution werden die Phagen mit nicht-affinen Antikörpern von denen, die Affinität zum Antigen aufweisen, abgetrennt. Die „affinen Phagen“ werden zur Vermehrung in Bakterien eingeschleust. Nach Extraktion der Phagen aus der Wirtskultur liegt ein Phagenpool vor, der gegenüber dem Pool der Vorrunde, mit affinen Antikörpern angereichert ist.

Eine ähnliche Methode wurde auch zur *in vitro*-Selektion von Peptiden und Proteinen angewandt. Hierbei wurden statt des V-Gens die entsprechenden codierenden Sequenzen der Peptide oder Proteine als Genotyp des Binders eingesetzt (Scott & Smith, 1990).

Eine weitere Methode zur *in vitro*-Selektion von Peptiden oder Proteinen arbeitet mit einem Fusionsprodukt zwischen Peptiden und ihren codierenden mRNAs. Die Koppelung beider Komponenten erfolgt hierbei über Purimycin, einem Peptidylakzeptor-Antibiotikum (Robertson & Szostak, 1997).

Um der Zersetzung von Peptid-Liganden im physiologischen Milieu entgegen zu wirken, wurde 1996 das „Spiegelbild-Phagen-Display“ (Mirror-Image Phage Display) entwickelt. Mit dieser Methode können D-Peptid-Liganden gegen natürliche L-Peptid-Targets gefunden werden (Schumacher *et al.*, 1996).

2.5. Chemische Modifikation von Ribonukleinsäureliganden

2.5.1. Verbesserung der Stabilität von RNAs in biologischen Lösungen

Eines der Hauptprobleme beim Einsatz von RNAs in biologischen Flüssigkeiten ist die Sensibilität der Ribonukleinsäuren gegenüber den dort anwesenden Nukleasen. Während die hochaffinen RNAs, die durch *in vitro*-Evolution erhalten wurden, durchaus vergleichbare Eigenschaften wie monoklonale Antikörper aufweisen, wurde ihre Anwendung im therapeutischem und diagnostischem Bereich durch die Instabilität in physiologischen Medien stark limitiert. Insbesondere erwies sich dabei der schnelle Abbau der RNA durch den Angriff von Ribonukleasen an der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose aber auch die Abspaltung des 3'-terminalen Nukleotids durch Exonukleasen als äußerst problematisch.

Um diesen Nachteil der hochaffinen Nukleinsäuren gegenüber den monoklonalen Antikörpern zu mindern, wurden die Oligomere durch Modifikation an der 2'-Position oder der Phosphatgruppe vor enzymatischen Angriffen geschützt (Eaton & Pieken, 1995). Hierzu ersetzte man die 2-Hydroxylgruppe des Nukleotids durch eine Aminogruppe (Leirdal & Sioud, 1998) oder Fluorogruppe (Pieken *et al.*, 1991), oder der Wasserstoff der 2'-Hydroxylgruppe wurde gegen eine Methyl- oder Allylgruppe ausgetauscht (Iribarren, 1990; Beigelman *et al.*, 1995). Diese Substitutionen an der 2'-Position des Zuckers verlangsamten den enzymatischen Abbau durch Ribonukleasen.

Im Gegensatz dazu erhöhte der Einsatz von Phosphorothioaten als Phosphorbrücke zum 3'-terminalen Nukleosid die Stabilität der Oligoribonukleotide gegenüber dem Angriff von Exonukleasen (Heidenreich *et al.*, 1995).

Eine weitere Strategie zur Stabilitätsverbesserung von Ribonukleinsäureliganden gegen enzymatische Angriffe ist das Spiegel-Design, auf das in Kapitel 2.6. noch näher eingegangen wird.

2.5.2. Modifikationen zur Struktur- und Funktionsuntersuchung

Für Strukturuntersuchungen an der RNA und zur Identifizierung funktioneller Gruppen im Molekül lassen sich Modifikationen an verschiedenen Positionen innerhalb der Ribonukleotidbausteine vornehmen. So können, wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, die 2'-Positionen modifiziert werden (Kazantev & Pace, 1998; Leirdal & Sioud, 1998). Phosphorothioat-Modifikationen wurden eingesetzt, um pro-Rp Sauerstoffe am Phosphatrest zu identifizieren, die mit der Bindung von Substrat an RNase P interferieren. Der Einsatz von 2'-Desoxyphosphorothioaten ermöglichte zusätzlich, die entsprechenden interferierenden 2'-OH-Positionen zu ermitteln (Hardt *et al.* 1995; Hardt *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu den Modifikationen an den Zucker- oder Phosphatresten der Ribonukleinsäuren können auch modifizierte Basen eingesetzt werden. Zur Aufklärung funktioneller Gruppen in RNase P wurden zum Beispiel die modifizierten Purinnukleoside 7-Deazaadenosin und 7-Deazaguanosin (Kazantev & Pace, 1998) verwendet. Mit dem Einsatz von halogenierten Basen, wie zum Beispiel 5-Iodouridin, wurden RNAs aufgrund der Fähigkeit zur Photo-Quervernetzung (photocross-linking) sowie der Eigenschaft, an das entsprechende Target zu binden, selektiert (Jensen *et al.*, 1995).

2.6. Spiegel-Design

Eine neuere Methode zum Schutz hochaffiner Ribonukleinsäuren vor enzymatischer Spaltung ist das Spiegel-Design (Klußmann *et al.*, 1996; Nolte *et al.* 1996). Mit diesem Verfahren werden RNA-Liganden, sogenannte Spiegelmer, entwickelt, die statt D-Ribose L-Ribose als Zuckerkomponente enthalten. Das Prinzip des Spiegel-Design (Abb. 7) basiert dabei auf der Tatsache, daß sich zwei Enantiomere eines Moleküls wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten. Da sie weder eine Symmetrieebene noch ein Symmetriezentrum besitzen, können sie durch Drehen nicht ineinander umgewandelt werden. Der Einbau von L-Ribose in das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäure bewirkt somit, daß sich die dreidimensionale Struktur einer L-RNA spiegelbildlich zu der Struktur der ihr entsprechenden D-RNA verhält. Da die natürlich vorkommenden Enzyme, gemäß dem für Enzym und Substrat geltendem Schlüssel-Schloß-Prinzip, ausschließlich D-RNA Moleküle als Substrat akzeptieren, sind L-RNA-Moleküle vor enzymatischer Umsetzung und somit auch vor der Spaltung durch Nukleasen geschützt.

Das Spiegel-Design basiert auf der Tatsache, daß Nukleinsäureliganden zwischen zwei Enantiomeren eines Moleküls unterscheiden können und mit hoher Spezifität an das als Target gewählte Enantiomer binden. Da die Verknüpfung von L-Nukleotiden auf enzymatischem Wege nicht erfolgt (auch die Enzyme, die bei der Replikation, T7 Transkription und reversen Transkription verwendet werden, erkennen nur die RNAs, die eine D-Ribose als Kohlenhydratkomponente enthalten), werden zunächst Liganden zum Enantiomer der eigentlichen Zielstruktur unter Verwendung der *in vitro*-Evolution selektiert. Sind diese Liganden gefunden, kloniert, sequenziert, charakterisiert und eventuell durch Deletionsanalysen zu kleineren funktionellen Molekülen verkürzt worden, so wird auf chemischem Weg die entsprechende L-Ribonukleinsäure, das Spiegelmer, synthetisiert. Anschließend können durch Überprüfen der Bindungseigenschaften des Liganden gegenüber seinem eigentlichen Targetmolekül und auch gegenüber dessen Enantiomer, Aussagen über die Affinität und Spezifität des Spiegelmers getroffen werden.

Bei entsprechenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Bindungskonstanten eines Spiegelmers zu seinem Zielmolekül der des entsprechenden D-Liganden zum Targetenantiomer entsprechen. Die jeweils nicht passenden Bindungspaare, d. h. Spiegelmer und Targetenantiomer sowie D-Ligand und Target, zeigen deutlich schlechtere Bindungskonstanten und beweisen somit die chirale Spezifität der RNA-Liganden.

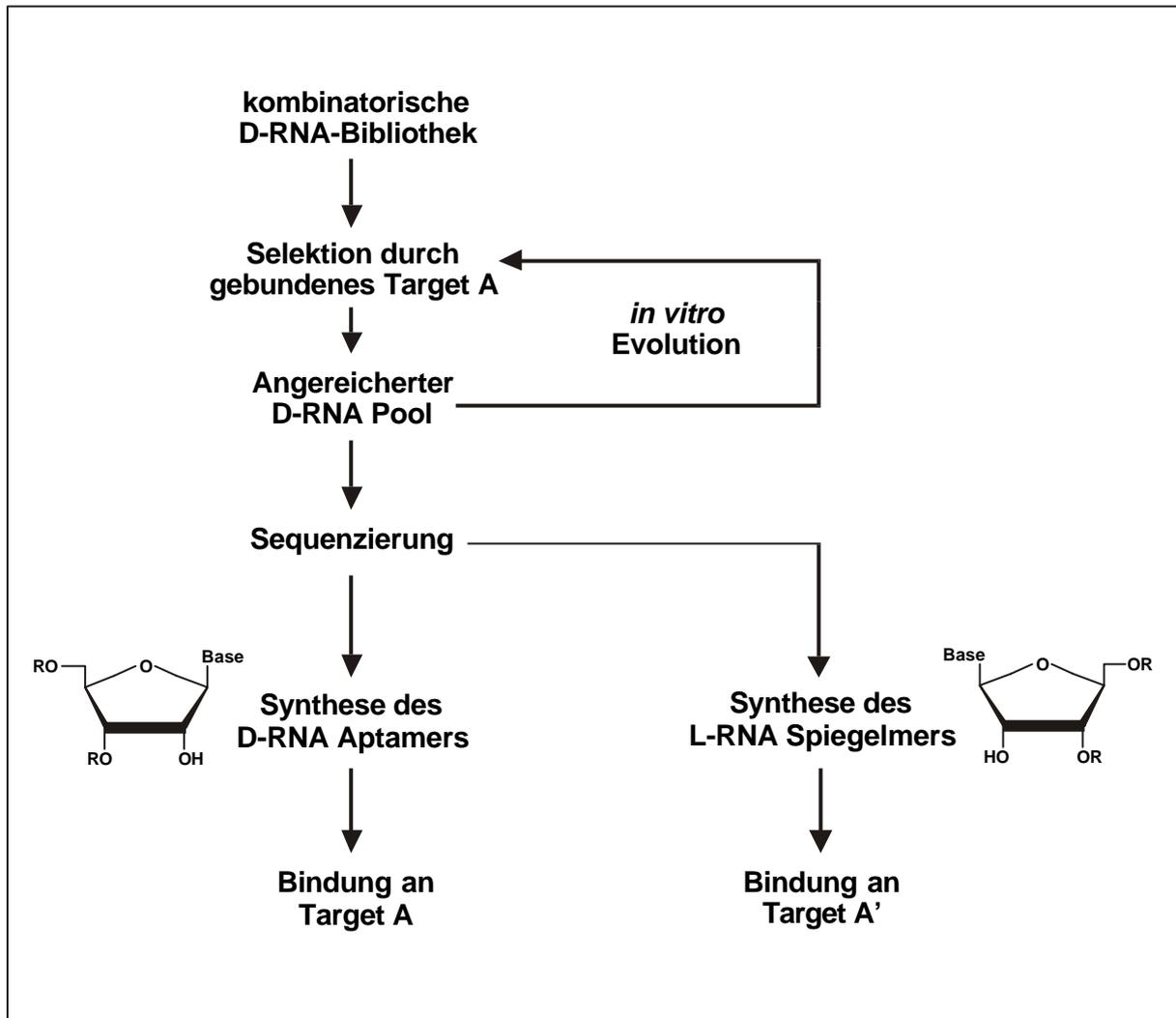


Abbildung 7: Das Prinzip des Spiegel-Design. Mit den Methoden der *in vitro*-Evolution werden D-RNA-Liganden gegen das Spiegelbild (A) des Targetmoleküls (A') selektiert. Das entsprechende Spiegelmer ist dann in der Lage das physiologische (natürliche) Target zu binden.

2.7. Bindungsstudien

2.7.1. RNA-Liganden

2.7.1.1. Gleichgewichtsdialyse und Gleichgewichtszentrifugation

Die Gleichgewichtsdialyse (Wrede *et al.*, 1978) und die Gleichgewichtszentrifugation (Jenison *et al.*, 1994) sind nichtkompetitive Verfahren zur Bestimmung von Bindungskonstanten hochaffiner Nukleinsäuren. Bei beiden Methoden wird entweder das Zielmolekül oder das daran bindende Oligomer radioaktiv markiert. Die jeweilige Reaktionszelle besteht dabei aus zwei Kompartimenten, die durch eine semi-permeable Membran voneinander getrennt sind. Nur das markierte Molekül darf dabei in der Lage sein, diese Membran zu passieren. Für den Komplex und das unmarkierte Molekül muß die Membran hingegen undurchlässig sein. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten findet im Gleichgewichtszustand der Komplexbildung statt. Dann werden Aliquots aus beiden Reaktionskompartimenten entnommen und die gemessenen Radioaktivitäten zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse wird in Kapitel 5.2. noch näher erläutert.

2.7.1.2. Mobility Gel Shift Assay

Der radioaktiv markierte Oligonukleotidligand wird mit einer Lösung des Targets in Bindungspuffer inkubiert. Dabei werden mehrere Ansätze mit verschiedenen Targetkonzentrationen bei gleichbleibender Ligandenkonzentration untersucht. Anschließend werden durch native Polyacrylamidgelelektrophorese Komplex und Ligand aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und damit auch unterschiedlicher Mobilität im Gel voneinander getrennt. Die Gele werden danach autoradiographiert und die Autoradiogramme ausgewertet. Der Mobility Gel Shift Assay eignet sich nur zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten, wenn das Targetmolekül ausreichend groß ist, so daß das Wanderungsverhalten des Liganden im Gel bei Komplexbildung ausreichend beeinflußt wird. Dies ist z. B. der Fall bei Proteinen oder Peptiden ausreichender Größe (Rigl *et al.*, 1997, Roy *et al.*, 1990).

2.7.1.3. Analytische Affinitätschromatographie

Bei der Säulenaффinitätschromatographie ist das Target (oder auch die hochaffine Nukleinsäure) am Säulenmaterial immobilisiert. Der radioaktiv markierte Bindungspartner wird in Puffer gelöst auf die Säule gegeben (MacKenzie *et al.*, 1994). Die Versuchsparameter entsprechen dabei im wesentlichen denen, die bereits im vorhergehenden SELEX Protokoll zur Selektion des Liganden verwendet wurden. Nachdem sich beide Komponenten auf der Säule befinden, wird solange mit Bindungspuffer gewaschen, bis im Eluat keine Radioaktivität mehr nachweisbar ist. Über die Messung der Radioaktivität kann das Elutionsvolumen und die Konzentration des eluierten Liganden bestimmt werden. Durch Kenntnis der Konzentration des immobilisierten Bindungspartners, des Säulenvolumens, des Totvolumens und des Eluatvolumens läßt sich dann eine apparente Dissoziationskonstante errechnen (Connell, 1993). Das Elutionsprofil kann ebenfalls für Aussagen über das Bindungsprofil genutzt werden. Bei diesem Verfahren werden zwei Meßgrößen zur Berechnung des K_d -Wertes benötigt (das Elutionsvolumen und die radioaktive Strahlung), was zu höheren Meßfehlern führen kann.

2.7.1.4. Fluorimetrisch mit Hilfe eines Biosensors

Hierzu wird hochaffine, am 3'-Ende biotinylierte RNA über eine Avidin-Biotin-Brücke an Fasern fixiert. Das Target ist mit einem fluoreszierendem Signalmolekül, wie zum Beispiel Fluorescein-Isothiocyanat, gekoppelt. Die Targetlösung wird in einer Durchflußzelle zum immobilisierten Liganden hinzu gegeben. Bei der Messung wird die Fließgeschwindigkeit variiert und eine Echtzeitmessung der Bindungsvorgänge durchgeführt. Als Meßgröße dient die totale interne Fluoreszenzreflektion. (Kleinjung *et al.*, 1998)

2.7.1.5. Fluoreszenzdepolarisationsstudien

Das Verfahren nutzt die Eigenschaft von Molekülen, in verschiedene Richtungen unterschiedliche physikalische Eigenschaften zu zeigen. Die Fluoreszenzdepolarisation wird vor allem durch die Rotationsdiffusion des Fluorophors und damit durch dessen Beweglichkeit in der Testlösung beeinflusst. Je höher die Mobilität des Moleküls ist, desto stärker ist auch seine Fluoreszenz depolarisiert.

Gemessen wird die Änderung der Anisotropie als Funktion der Ligandenkonzentration. Ein starker Größenunterschied zwischen fluoreszierendem Molekül und Komplex wirkt sich entscheidend auf eine Änderung der Anisotropie der Fluoreszenz aus (Wang *et al.*, 1996).

Bei der Bestimmung von Bindungskonstanten durch Messung der Fluoreszenzanisotropie muß einer der beiden Komplexbildner mit einem fluoreszierendem Signalmolekül gekoppelt sein. Als Fluoreszenzmarker können dabei Fluorescein oder dessen Derivate verwendet werden. Der fluoreszierende Bindungspartner (meist das derivatisierte Target) wird mit dem nichtfluoreszierenden Komplexbildner (Nukleinsäureligand) titriert.

2.7.2. Antikörper

2.7.2.1. Surface Plasmon Resonance (SPR)

Anhand der SPR-Technologie in Kombination mit Biosensoren können biospezifische Interaktionen in Echtzeit gemessen werden (Jönsson, 1991). Dadurch können sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen über reversible Bindungsvorgänge von biologischen Makromolekülen getroffen werden (Barbas & Burton, 1996). Physikalische Meßgröße in diesem System ist die Veränderung des Brechungsindex. Somit ist weder ein Chromophor noch eine Markierung der Makromoleküle notwendig.

Oberflächenplasmonen sind Wellen oszillierender Oberflächenladungsdichte, die über eine metallische Oberfläche wandern. Durch eine Änderung des Brechungsindex bei Komplexbildung oder Dissoziation des Komplexes an der Oberfläche des Sensors, verändert sich auch der Resonanzwinkel, welcher die eigentliche Meßgröße darstellt. Das Ausmaß der Änderung von Brechungsindex und damit auch des Resonanzwinkels ist dabei proportional zur Komplexkonzentration (Garland, 1996).

Einer der beiden Reaktanten (entweder Antigen oder Antikörper) wird dabei an einer Sensorchipoberfläche immobilisiert, während der zweite Reaktant kontinuierlich mit dem Puffer über diesen Sensor fließt. Die Interaktionen zwischen Antikörper und Antigen werden dann mittels SPR detektiert, direkt registriert und als Sensorgramm präsentiert. Anhand des Sensorgramms können sowohl die Dissoziationskonstanten berechnet als auch die Bindungsmuster beobachtet werden.

2.7.2.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Der ELISA-Test ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Antikörper-Antigen-Komplexen. Bei dieser Methode wird die Komplexbindung im Gleichgewichtszustand gemessen. Es werden die Spezifität der Antikörper mit der Selektivität eines einfachen spektrometrischen Enzymtests verbunden. Prinzipiell ist die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion an eine enzymatische Reaktion gekoppelt. Es werden entweder Antikörper- oder Antigen-Enzymkonjugate verwendet, die nach Zugabe von geeignetem Substrat durch die Messung der Enzymaktivität meist photometrisch bestimmt werden kann. Der Substratumsatz des Enzyms sorgt dabei für eine Verstärkung des Meßeffectes, da ein Enzym-Mol viele Substrat-Mole umsetzen kann, während der Antikörper das Antigen stöchiometrisch bindet. Bei der Festphasen-Technik des ELISA ist das Antigen entweder durch direkte Immobilisierung oder über einen weiteren Antikörper („Sandwich“-Methode) an die feste Phase gebunden (Kemeny & Challacombe, 1988).

2.7.2.3. Fluorescence ImmunoAssay (FIA)

Bei der Methode des FIA werden die Spezifität des Antikörpers mit der Sensitivität eines fluorimetrischen Tests gekoppelt. Meist ist der Antikörper mit einem fluoreszierenden Chromophor markiert. Bei der SLFIA (homogeneous Substrate-Labelled Fluorescent ImmunoAssay) ist das Antigen kovalent an ein Markermolekül (z. B. Galactosylumbelliferon) gebunden. Dieser Marker fluoresziert nur, wenn er ungebunden vorliegt, nicht jedoch solange er an das Antigen gebunden ist. Ist das Antigen nicht in einem Antigen-Antikörper-Komplex, so kann das Markermolekül enzymatisch (durch β -Galactosidase) vom Antigen hydrolysiert werden. Die Konzentration des freien Signalmoleküls ist proportional zur Komplexkonzentration. Meßgröße ist die relative Fluoreszenzintensität des freien Markers.

2.8. Adenosin und seine physiologische Bedeutung

Adenosin übt eine Vielzahl von Effekten auf den Organismus aus, was durch die breite Verteilung von Adenosin-Rezeptoren im Gewebe zurückzuführen ist. Man hat bis jetzt mehrere Adenosin-Rezeptoruntertypen identifiziert. Einige davon wurden bereits kloniert. Zu den klonierten Untertypen gehören der A1-, A2A-, A2B- und A3-Rezeptor (Feotistov, 1998). Desweiteren wird eine Unterteilung in A1A und A1B sowie ein A4 Rezeptor diskutiert (Tucker & Linden, 1993).

Adenosin scheint als modulierende Substanz unter anderem im Herz-, Blut-, Ileum-, Samenleiter- und Fettgewebe zu wirken. Auch lassen sich durch die Gabe von Adenosin Reaktionen in den Bronchien, der Harnblase, der Darmmuskulatur (*Taenia coli*), den Zellen der Magenwand und bei der Renin-Sekretion (Balakrishnan, 1996) hervorrufen. Im zentralen Nervensystem zeigt Adenosin antikonvulsive (Lee *et al.*, 1984), sedierende und hypothermische Wirksamkeit (Contreras, 1990). Es wirkt unter anderem vasodilatatorisch (Pearl, 1994), bronchokonstriktorisch (Pauwels & Joos, 1995), ist an der Histaminfreisetzung durch Mastzelldegranulation beteiligt (Linden, 1994; Church *et al.*, 1983) und spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Steuerung des männlichen Reproduktionssystems (Rivkees, 1994).

Neuere Untersuchungen durch Sawynok ergaben, daß sowohl Adenosin als auch ATP mehrfachen Einfluß auf die periphere und auch spinale Schmerzübertragung haben. Man nimmt an, daß Adenosin peripher zum ischämischen Schmerz beiträgt, während andererseits eine Adenosin-Rezeptoraktivierung im Rückenmark die Schmerzübertragung bei entzündlichem, neuropathischem und akutem Schmerz unterdrückt. Endogene Adenosinsysteme tragen zur antinozizeptiven (die Schmerzübertragung hemmenden) Wirkung von Koffein, Opiaten, Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin, und tricyclischer Antidepressiva bei (Sawynok, 1998).

Bereits 1994 entdeckten MacKenzie *et al.*, daß das Purinnukleosid die Erkennung von Tumorgewebe durch anti-CD3-aktivierte Killerzellen stört. Dieser immunsuppressive Effekt ist vermutlich auf die Blockierung von A3-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der zytolytischen Effektorzellen befinden, zurückzuführen. Adenosin wird verstärkt in den mit Sauerstoff unterversorgten Regionen solider Tumore gebildet (MacKenzie *et al.*, 1994) und liegt somit in diesen Bereichen in erhöhter Konzentration vor.

In Tierstudien wurde im gleichen Jahr durch Kanda *et al.* eine Beeinflussung der locomotorischen (den Bewegungsablauf beeinflussenden) Aktivität durch Adenosin-Rezeptor-

stimulation festgestellt, was bei der Suche nach neuen Arzneimitteln gegen die Parkinson'sche Krankheit von Interesse sein kann (Kanda *et al.*, 1998).

Adenosin ist das Nukleosid des Adenins. Durch Phosphorylierung entstehen die Adenosinphosphate Adenosin-5'-monophosphat (AMP), zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Auf die physiologischen Aufgaben der einzelnen Adenosinphosphate soll hier nur kurz eingegangen werden:

AMP hat unter anderem eine stark gefäßerweiternde Wirkung und wird deshalb als Kreislaufmittel eingesetzt. Die zyklische Form cAMP (cyclischer Phosphodiester) spielt als sogenannter „Second Messenger“ eine zentrale Rolle in der hormonalen Regulation des Zellstoffwechsels. Eine Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren ruft häufig eine Erhöhung der cAMP Konzentration hervor.

ADP ist als Phosphatgruppenakzeptor an Phosphorylierungsreaktionen beteiligt. Es weist ebenfalls vasodilatorische Wirkung auf.

ATP ist der wichtigste Energielieferant des Intermediärstoffwechsels. Die Energie wird durch hydrolytische Spaltung freigesetzt. Dabei entsteht entweder ADP und anorganisches Phosphat oder AMP und anorganisches Pyrophosphat. Für viele ATP-abhängige Enzyme hat es die Bedeutung eines Cofaktors. Es ist unter anderem an folgenden Reaktionen beteiligt:

- der Phosphorylierungen im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel,
- der Regeneration von Triphosphaten aus den entsprechenden Disulfaten,
- der Regeneration von Kreatinphosphat,
- der Aktivierung von Aminosäuren,
- der Aktivierung von Fettsäuren und
- der Aktivierung von Ribose.