

---

## 6. DISKUSSION

Diagnostika dienen der Überprüfung von Zustand und Funktion des menschlichen Körpers und seiner Organe. Sie können prinzipiell im und am Organismus (unmittelbar) oder außerhalb des Körpers (mittelbar) angewandt werden. Zu den mittelbaren Diagnostika zählen unter anderem die Reagenzien der Harn- und Blutanalytik. Die unmittelbaren, oral oder parenteral zu applizierenden Diagnostika können für die Stoffwechsel-, Funktions- und Organdiagnostik verwendet werden (Roth & Fenner, 1988). Diagnostika dienen der Kontrolle des Krankheitsverlaufs, der Therapiekontrolle sowie der Therapiesteuerung. Sie können chemischer, biochemischer oder immunologischer Herkunft sein. Die mit Diagnostika durchgeführten Bestimmungsmethoden sollten bei hoher Spezifität, Genauigkeit und Nachweisempfindlichkeit schnell und einfach durchführbar und nach Möglichkeit auch automatisierbar sein.

Viele diagnostische und umweltanalytische Verfahren beruhen darauf, bestimmte Substanzen und deren Konzentrationen in physiologischen oder nichtphysiologischen Testmedien nachzuweisen. Die Art und Funktion des nachzuweisenden Moleküls kann dabei stark variieren. Es kann sich dabei um makro- oder niedermolekulare körpereigene Stoffe aber auch um Arznei- oder Giftstoffe (z. B. Pestizide) handeln, deren Konzentration im Serum, in Organen oder auch in Boden- oder Luftproben nachzuweisen sind. Da die Konzentration der nachzuweisenden Stoffe häufig sehr niedrig ist, ist es wichtig, empfindliche und zuverlässige analytische Methoden zur Verfügung zu haben.

Bei der Suche nach neuen Diagnostika ist die Bestimmung der Bindungskonstanten des Targetkomplexes von essentieller Bedeutung. Die Wechselwirkungen zwischen einem Diagnostikum und dessen Zielstrukturen werden durch physikalisch-chemisch definierbare Bindungskräfte bestimmt. Das Ausmaß dieser Kräfte hängt von der Art und Anzahl der Partialstrukturen ab, die an der Bindung beteiligt sind. Auch die stereochemischen Möglichkeiten, die die Moleküle zur Anpassung an makromolekulare Bindungspartner (z. B. Proteine und Rezeptoren) oder auch kleinere Targetstrukturen (z. B. niedermolekulare Arzneistoffe, Neurotransmitter) haben, wirken sich entscheidend auf die Stärke der Komplexbildung aus.

---

In der modernen Labordiagnostik haben sich Immunoassays aufgrund der hohen Spezifität der hierbei verwendeten Antikörper etabliert. Antigene Substanzen werden dabei *in vitro* durch Antigen-Antikörper-Reaktionen als Prinzip immunologischer und serologischer Testverfahren mit unterschiedlichem Testaufbau nachgewiesen. Antigene und Antikörper können dabei frei (gelöst) oder gebunden, markiert oder unmarkiert vorliegen. Die Möglichkeit der Markierung eines Antikörpers ist dabei vielfältig (z. B. mit einem Radionuklid, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym) und hängt vom gewählten Nachweisverfahren ab. Bei den Immunassays können kompetitive und nichtkompetitive Nachweismethoden angewandt werden. Die Antigen-Antikörper-Komplexbildung kann direkt (z. B. turbimetrisch, nephelometrisch oder mit Hilfe der Biosensorik) oder indirekt (anhand der Markierung) ausgewertet werden.

Bei kompetitiven Immunassays werden die nicht durch ein Antigen gebundenen Bindungsstellen des Antikörpers durch Zugabe eines weiteren markierten Antikörpers (Anti-Komplex-Antikörper, Reporter) nachgewiesen (Cook & Self, 1995). Der Nachweis ist besonders problematisch, wenn geringe Konzentrationen einer antigenen Struktur bestimmt werden sollen. In diesem Fall wird eine große Menge des Reporters gebunden. Das Ausgangssignal ist daher zwangsläufig hoch. Der Unterschied der Signalstärke zweier Proben mit niedrigen, aber unterschiedlichen Antigenkonzentrationen wird somit im Verhältnis zur Gesamtsignalstärke sehr klein. Kompetitive Assays besitzen deshalb eine eingeschränkte Sensitivität. Eine weitere Variante eines kompetitiven Immunassays ist der Einsatz zweier Antikörper, die miteinander um das Antigenepitop konkurrieren. Bei Zugabe des zweiten Antikörpers, wird der erste aus dem gebildeten Komplex verdrängt. Nachgewiesen wird dann die Konzentration des freien ersten Antikörpers.

Zu den wichtigsten nichtkompetitiven Immunassays zählt das Sandwich-Verfahren. Bei diesem Assay werden ebenfalls zwei Antikörper eingesetzt. Diese konkurrieren jedoch nicht miteinander um die gleiche Bindungsstelle. Entweder erkennen sie verschiedene Epitope des Antigens oder der zweite Antikörper bindet an den bereits im Komplex befindlichen, ersten Antikörper. In beiden Fällen ist der nachträglich zugegebene Antikörper markiert und seine Komplexkonzentration wird gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hier erstmals ein System zur direkten und nichtkompetitiven Bestimmung von Dissoziationskonstanten zwischen einem Liganden und seinem Targetmolekül durch Fluoreszenztitration entwickelt. Diese Methode arbeitet ohne Markierung mit

---

radioaktiven Isotopen und verknüpft zwei Techniken miteinander, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben:

- die *in vitro*-Evolution von Nukleinsäuren und
- die Fluoreszenzspektroskopie.

### **6.1. *In vitro*-Evolution von Nukleinsäuren**

Die *in vitro*-Evolution bietet die Möglichkeit, ausgehend von großen Nukleinsäurebibliotheken hochaffine RNAs (haRNAs) oder DNAs (haDNAs) gegen nahezu jedes beliebige Target (z. B. Arzneistoffe, Hormone, Neurotransmitter, Metaboliten, Proteine und Pestizide) zu entwickeln (Gold *et al.*, 1995; Uphoff *et al.*, 1996). Diese Nukleinsäureliganden, die je nach ihrer Struktur als Aptamere (Ellington & Szostak, 1990) oder Spiegelmere (Klußmann *et al.*, 1996) bezeichnet werden können, binden ihr Target wie ein Antikörper mit hoher Affinität und Spezifität. Durch negative Selektion wurden bereits Aptamere entwickelt, die mit einer zehnfach höheren Selektivität zwischen den Xanthinderivaten Theophyllin und Koffein unterscheiden konnten als der entsprechende monoklonale Antikörper (Jenison *et al.* 1994). Das entwickelte Theophyllin-Aptamer könnte somit deutlich genauere Ergebnisse bei der Kontrolle des Serumspiegels von asthmatischen Patienten, die zusätzlich zur Theophyllin-Therapie koffeinhaltige Getränke zu sich nehmen, liefern. Die ersten mit dem SELEX-Verfahren entwickelten Aptamere befinden sich bereits in der klinischen Prüfung. So wurde z. B. im August dieses Jahres ein mit dem SELEX-Verfahren entwickeltes Aptamer, das inhibitorisch auf den Wachstumsfaktor des Gefäßendothels (Vascular Endothelial Growth Faktor, VEGF) wirkt, in den USA zu klinischen Studien bei altersbedingter Makulardegeneration zugelassen (NeXstar, Presseveröffentlichung vom 27. August 1998).

Hochaffine Nukleinsäuren zeichnen sich im Vergleich zu Antikörpern durch ihren einfachen Aufbau und ihre geringe Größe aus. Während ein Nukleinsäureligand aus einer oder zwei miteinander hybridisierten kurzen Oligonukleotidketten (ca.15 bis 60 Nukleotide) besteht, ist ein IgG-Antikörper aus vier Polypeptidketten zusammengesetzt, die zudem noch über mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Mit einer molaren Masse von ca. 150.000 Da enthält ein Antikörper ca. 1360 Aminosäuren.. Ein großer Vorteil, den hochaffine

Nukleinsäuren somit gegenüber Antikörpern haben, ist die Möglichkeit, sie chemisch herstellen zu können.

Die chemische Synthese bietet ein Werkzeug zum Einbau modifizierter Nukleotide an vorbestimmte Positionen innerhalb eines Liganden. Dies ist z. B. wichtig für die Stabilisierung eines Liganden gegenüber enzymatischer Spaltung oder auch bei der Strukturanalyse von Nukleinsäureliganden bzw. Liganden-Target-Komplexen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Positionierung eines fluoreszierenden Reporternukleotids in einen durch *in vitro*-Evolution gewonnenen RNA-Liganden genutzt, um einen Fluoreszenzassay zur direkten Bestimmung von Bindungskonstanten zu entwickeln. Als Testsequenz für die Synthese fluoreszierender Oligoribonukleotide und für den Aufbau des direkten Nachweisverfahrens wurde der an L-Adenosin bindende RNA-Ligand D-A649\_38 gewählt. Dieser wurde 1996 von Dr. Sven Klußmann durch *in vitro*-Evolution und nachfolgender Deletionsanalyse im Rahmen seiner Dissertation über die Identifizierung und Charakterisierung hochaffiner L-RNA-Moleküle entwickelt (Klußmann, 1996). Die Vorhersage der Sekundärstruktur des Liganden erfolgte durch das Computerprogramm RNA FOLD, dem der Faltungsalgorithmus nach Zuker und Stiegler zugrunde liegt (Zuker & Stiegler, 1981; Zuker 1989). Der benutzte RNA-Ligand besteht aus zwei hybridisierten D-Oligoribonukleotidsträngen, von denen jeder 19 Nukleotide lang ist. Bei der hierbei entwickelten, fluoreszierenden haRNA läßt sich das Stabilitätsproblem der Nukleinsäuren gegenüber enzymatischer Spaltung prinzipiell lösen. Der Ligand D-A649\_38εA25 bindet an L-Adenosin, dem Enantiomer des physiologisch vorkommenden D-Adenosins. 1996 wiesen Klußmann *et al.* und Nolte *et al.* nach, daß ein L-Ligand die gleiche Affinität zu einem physiologischen Target aufweist wie der D-Ligand zum unphysiologischen Targetenantimer. Durch Einbau von L-1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin in das entsprechende L-A649\_38εA25, dem Spiegelmer des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Liganden, erhält man eine hochaffine L-RNA, die an das physiologische D-Adenosin bindet und nukleasestabil ist. Es ist daher als Diagnostikum in biologischen Flüssigkeiten einsetzbar.

---

## 6.2. Fluoreszenzstudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemische Synthese von Ribonukleinsäuren genutzt, um einen fluoreszierenden Liganden durch Integration eines Reportermoleküls an definierter Position der Sequenz eines nichtfluoreszierenden Liganden herzustellen. Der neu entwickelte Ligand zeichnet sich dadurch aus, daß er zusätzlich zur hohen Affinität und Sensitivität gegenüber seines Targets auch direkt - also ohne zusätzliche Markierungsschritte an Ligand oder Target - zur nichtkompetitiven Bestimmung von Dissoziationskonstanten und Targetkonzentrationen eingesetzt werden kann.

Fluorimetrische Verfahren haben in den letzten Jahren in der Molekularbiologie, der klinischen Diagnostik aber auch in der Umweltanalytik aufgrund ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit an großer Bedeutung bei der Beschreibung von Bindungsvorgängen gewonnen. Da jedoch nur wenige Targetstrukturen selbst fluoreszierende Eigenschaften besitzen, muß für gewöhnlich entweder der Binder selbst oder aber das Target mit einer fluoreszierenden Reportergruppe gekoppelt werden. Wird einer der beiden Bindungs-partner nach Identifizierung des Liganden verändert, kann dies zum Verlust der ursprünglichen Bindungseigenschaften führen.

Bei den Immunassays, die mit Hilfe von fluorimetrischen Methoden ausgewertet werden, spielt die Sandwich-Methode eine große Rolle. Der Sandwich-Assay ist die sensitivste Form der Immunassays. Als Reportergruppe nutzt er einen zweiten Antikörper, über den die Konzentration des eigentlichen Antikörper-Antigen-Komplexes bestimmt wird. Durch Kopplung des Sandwich-Verfahrens mit einer fluorimetrischen Detektionsmethode können zwei sehr empfindliche Verfahren miteinander gekoppelt werden, was zu sehr guten Meßergebnissen auch bei geringen Targetkonzentrationen führt. Ein großer Nachteil bei der Entwicklung von Sandwich-Assays ist die Schwierigkeit der Herstellung von Antikörpern gegen niedermolekulare Stoffe wie z. B. das bei dieser Arbeit verwendete Adenosin. Zum einen ist es generell problematisch, bei niedermolekularen Verbindungen, wie es die meisten Arzneistoffe, Drogen, Umweltgifte, kleinere Peptide und Metaboliten sind, Antikörper gegen zwei unterschiedliche Epitope der antigenen Struktur zu entwickeln. Ein weiteres Problem ist es, daß beim Sandwich-Assay beide Antikörper gleichzeitig an das antigene Molekül binden müssen. Damit läßt sich das Sandwich-Verfahrens zum Nachweis sehr kleiner Moleküle nicht mehr anwenden.

---

Mit dem hier entwickelten Verfahren für hochaffine Nukleinsäuren ist es hingegen möglich auch sehr kleine Moleküle in der klinischen Diagnostik nachzuweisen. Bei fluorimetrischer Quantifizierung von Komplexen zwischen hochaffinen Nukleinsäuren und ihrem Target war es bisher notwendig, den Analyten nach der Selektion durch Kopplung mit einer fluoreszierenden Reportergruppe zu modifizieren. Somit wurde nicht die Affinität zwischen Ligand und Target, sondern die Affinität zum modifizierten Bindungspartner gemessen. Erst mit der kompetitiven Verdrängung des modifizierten Moleküls durch seine unmodifizierte Variante, konnten Erkenntnisse über den Bindungsvorgang gesammelt werden, der untersucht werden sollte. Nachteil einer kompetitiven Bestimmung von Bindungskonstanten gegenüber eines nichtkompetitiven Assays ist die größere Ungenauigkeit des Verfahrens. Bei Anwendung eines kompetitiven Verfahrens werden zwei Bindungsvorgänge quantifiziert. Dieses kann zu einer erhöhten Meßungenauigkeit führen. Ein Vergleich von Dissoziationskonstanten, die mit nichtkompetitiven und kompetitiven Verfahren parallel ermittelt wurden, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den ermittelten  $K_d$ -Werten (Jenison *et al.*, 1994; Klußmann, 1996). Der bei dem neuentwickelten Verfahren eingesetzte Ligand hingegen hat eine fluoreszierende Reportergruppe in seiner Sequenz integriert. Somit ist eine fluorimetrische Quantifizierung auch ohne zusätzliche Markierung des Targets möglich.

### 6.2.1. 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin

Bei dieser Arbeit wurde 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin als Fluorophor zum Einbau in einen RNA-Liganden gewählt. Die Base 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenin kann physiologisch durch den Kontakt mit Vinylhalogeniden, Urethanen und Vinylcarbamaten aus Adenin gebildet werden (Barbin *et al.*, 1975). Diese karzinogenen Verbindungen sind gängige Industriechemikalien und werden durch das Cytochrom-P450 System zu ihren entsprechenden Epoxiden metabolisiert. Die so entstandenen hoch reaktiven Verbindungen können Adenosin, Cytosin und Guanosen zu den zyklischen DNA-Addukten, 1,N<sup>6</sup>-Ethenodesoxyadenosin, N<sup>2</sup>,3-Ethenodesoxyguanosin und 3,N<sup>4</sup>-Ethenodesoxycytosin modifizieren. In den betroffenen DNA-Regionen entstehen dann Fehler bei der Replikation und Transkription (Barbin *et al.*, 1981; Hall *et al.* 1981; Kusmieriek & Singer, 1982).

1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin weist große strukturelle Ähnlichkeit zum natürlich in der Nukleinsäure vorkommendem Adenosin auf. Als Nukleotid unterbricht es das Zucker-Phosphat-Rückgrat

---

der Nukleinsäurestruktur nicht. Außerdem besitzt das fluoreszierende Nukleotid in etwa die gleiche Größe wie die vier natürlichen Nukleotide und sollte deshalb die Sekundär- und Tertiärstruktur des Liganden und somit auch die Bildung eines Liganden-Target-Komplexes kaum beeinflussen. Als aromatischer Fluorophor ist es bei Anregung durch Licht zur Eigenfluoreszenz fähig und kann bei entsprechenden Versuchsanordnungen als Elektronendonator verwendet werden. 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin zeigt starke Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von 20 nsec in Wasser. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 300 nm liegt das Fluoreszenzmaximum im neutralen Milieu bei 410 nm (Barrio *et al.*, 1972).

Die Platzierung des 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosins in eine Loop- oder Bulge-Region des Liganden wurde gewählt, damit keine Doppelstrangregionen oder Helixstrukturen durch Störung von Watson-Crick Basenpaarungen aufgebrochen werden. Durch die Ethenobrücke zwischen den Positionen N1 und N6 des Adenosins und dem dadurch entstandenen zusätzlichen dritten Ring im Molekül steht der Wasserstoff an N1 des Adenosins nicht mehr für die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoff des Uridins zur Verfügung. An der Position N6 ändert sich außerdem die sterische Ausrichtung des freien Elektronenpaares des Stickstoffatoms. Auch hier kann keine Wasserstoffbrücke mehr mit Uridin ausgebildet werden.

Lange Zeit war die Modifizierung von Adenosin im RNA-Molekül durch Reaktion mit Chloracetaldehyd (Digweed *et al.*, 1981) die einzige etablierte Möglichkeit, den Fluorophor in eine Nukleinsäure einzuführen. Durch Behandlung einer Ribonukleinsäure mit Chloracetaldehyd werden ebenfalls nur die Adenosin-Positionen modifiziert, die nicht Bestandteil eines Basenpaares sind. Allerdings ist es auf diese Weise nicht möglich, nur eine bestimmte Position zu modifizieren, wie dies bei der chemischen RNA-Synthese möglich ist.

Der Einsatz von 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin als fluoreszierende Reportergruppe in Ribonukleinsäuren wurde schon häufig für Struktur- oder Funktionsanalysen physiologischer RNAs genutzt. So zeigten Digweed *et al.* in ihrer Arbeit von 1981, daß das Ausmaß der Fluoreszenzmodifikation einer 5S RNA Einfluß auf ihren Einbau in die entsprechenden Ribosomenuntereinheiten und auf die biologische Aktivität hatte. Es zeigte sich, daß die Abnahme der biologischen Aktivität bei einer statistischen Modifikation von einem Adenosin pro Molekül, durch die Strukturänderung der 5S RNA hervorgerufen wird.

Paulsen und Wintermeyer ersetzten 1984 ein Adenosin am 3'-Ende (Position 76) und an Position 73 der tRNA<sup>Phe</sup> durch 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin mit Hilfe der T4 RNA-Ligase, um Strukturuntersuchungen durchzuführen (Paulsen & Wintermeyer, 1984). Sie konnten zeigen,

daß durch Einbau des Fluorophors am 3'-Terminus keine Aminoacylierung der tRNA mehr möglich ist, während der Austausch von Adenosin an Position 73 weder eine Auswirkung auf die Aminoacylierung noch auf die Proteinsynthese hat. Die Fluoreszenz der Reportergruppe wird jedoch durch den Einbau an Position 73 fast vollständig unterdrückt.

### 6.2.2. Chemische Synthese fluoreszierender Ribonukleinsäuren

Als besonders problematisch bei der chemischen Synthese von Nukleinsäuren, die 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin enthalten, erwies sich die alkalische Entschützung. Bereits nach zweistündiger Behandlung mit wäßrigem Ammoniak zeigen sich erste Zersetzungerscheinungen des Fluorophors (Srivastava, *et al.*, 1994). Synthesen von Ribonukleinsäuren mit „Standard“-Phosphoramiditen, die eine Inkubationszeit mit einer Mischung von wäßrigem Ammoniak und Ethanol von 24 h in ihrem Entschützungsprotokoll vorsehen, resultierten, wie erwartet, in einer fast vollständigen Zerstörung der Reportergruppe. Synthesen, die mit den leichter alkalisch hydrolysierbaren „PAC“-Phosphoramiditen vorgenommen wurden, lieferten unter wasserfreien Entschützungsbedingungen deutlich bessere Ergebnisse. Hier konnten kurze Testsequenzen (Decamere) synthetisiert und aufgereinigt werden, deren Anteil an zersetztem Fluorophor bei unter 20 % lag. Probleme ergaben sich erst bei der Synthese längerer Oligoribonukleotide. Bei der Aufreinigung dieser Synthesen waren starke Nebenproduktbanden zu erkennen, die auf eine unvollständige Entschützung und auf Fehlsequenzen (kürzere oder verzweigte Nukleinsäuren) hinwiesen. Die Syntheseausbeute war dadurch zu gering, um weitere Untersuchungen mit diesen Sequenzen durchzuführen.

An Synthesen, die mit *t*BPA-geschützten Phosphoramiditen durchgeführt wurden, wurden zwei Entschützungsvarianten untersucht. Die Entschützung mit gasförmigem Ammoniak unter Druck lieferte ebenfalls zu geringe Syntheseausbeuten für weitere Untersuchungen. Diese Methode wurde 1996 von Boal *et al.* zur Entschützung von unmodifizierten DNA-Synthesen beschrieben. Durch die großen Silylschutzgruppen an den 2'-Hydroxylgruppen der synthetisierten RNAs ist der nukleophile Angriff der Hydroxylionen bei der alkalischen Hydrolyse sterisch gehindert. Dies kann ein Grund für die schlechteren Ergebnisse bei der Aufarbeitung von chemisch synthetisierten Ribonukleinsäuren sein.

Nach Entschützung von *t*BPA-geschützten Nonadecameren mit einem Gemisch von wäßrigem Ammoniak und Ethanol bei einer Inkubationszeit von 30 min lag der Anteil an zersetztem 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin nur noch bei unter 5 %. Die nach der Entschützung und

Aufreinigung einer 1µmol-Synthese erhaltenen Mengen lagen hierbei im Bereich von 0,5 bis 1,3 mg Substanz. Diese Methode der Herstellung von Ribonukleinsäuren ermöglichte es, ausreichende Mengen an fluoreszierender RNA herzustellen, um sie für den Einsatz in einem Fluoreszenzassay zur Bestimmung von Bindungskonstanten, für Nukleosidanalysen und für Gleichgewichtsdialysen einsetzen zu können.

### 6.2.3. Positionierung des Fluorophors für direkte Bindungsstudien

Der verwendete RNA-Ligand D-A649\_38εA25 enthält nach Aussagen der Sekundärstrukturvorhersage vier Adenosine, die sich in einer Bulge- oder Loop-Position befinden. Die Loop- und Bulge-Regionen der DNA- und RNA-Liganden werden als entscheidend für die Liganden-Target-Komplexbildung angesehen. Man vermutet diese Sekundärstrukturausbildungen häufig in den entsprechenden Bindungstaschen der Oligoribonukleotidliganden (Zimmermann *et al.*, 1997; Feigon *et al.*, 1996). Sowohl elektrostatische Interaktionen als auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Targetmolekül gelten in diesen Regionen als sehr wahrscheinlich. Dieses scheint sich auch in den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden, zu bestätigen. Es wurden verschiedene Adenosine innerhalb des Liganden durch 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin ausgetauscht. Drei der vier Modifikationen des Ausgangsliganden zeigten Bindungskonstanten, die um das mindestens 18-fache höher lagen, als die des unmodifizierten Binders. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die Adenosine in diesen Positionen für die Bindung mit dem Targetmolekül von Bedeutung sind. Die Komplexbildung kann z. B. durch nicht aufzubauende Wasserstoffbrücken zwischen der Base und dem Target gestört worden sein. Ferner ist eine sterische Hinderung der Einlagerung des Targets in die Bindungstasche durch den zusätzlichen Imidazolring möglich. Als weitere Möglichkeit ist eine Störung bei der Ausbildung der Tertiärstruktur in Betracht zu ziehen. Auch in diesem Falle können sich die veränderten Verhältnisse an den Stickstoffatomen der Base bei der Ausbildung von Interaktionen zwischen verschiedenen Basen als störend erweisen.

Eine Modifikation des Ursprungsliganden an Position 25 resultiert in einer Bindungskonstanten, die nur um das etwa 1,5-fache erhöht war. Der Einbau des Fluorophors in dieser Position hat eine Zunahme der Fluoreszenz des Liganden bei Titration mit steigenden Targetkonzentrationen zur Folge. L-Adenosin selbst weist unter den Testbedingungen keine Fluoreszenz auf, so daß sich die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Titration auf eine

Konformationsänderung des Liganden bei Komplexbildung zurückführen läßt. Aufgrund des Anstiegs der relativen Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 300 nm und einer Emissionswellenlänge von 410 nm kann die Dissoziationskonstante des Liganden-Target-Komplexes direkt ermittelt werden.

Das Auftreten einer Fluoreszenzsteigerung statt -löschung weist zudem darauf hin, daß das Reporternukleotid, wenn es sich an Position 25 befindet, nicht direkt mit dem Target interagiert. Statt dessen scheint sich die aromatische Dreiringstruktur der Base bei Bindung an das Target durch eine Konformationsänderung der Oligoribonukleotidstruktur aus dem entstehenden Komplex herauszudrehen. Der Fluorophor steht dann nicht mehr in direktem Kontakt zu den benachbarten Basen, was einen Energieaustausch auf Donor-Akzeptor-Basis erschwert oder gar unterdrückt.

Die Fluoreszenzintensität des 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosins ist sehr sensitiv gegenüber Basenstapelung (base stacking). Schon der Einbau in das Dinukleotid ( $\epsilon A$ )p( $\epsilon A$ ) senkt die relative Fluoreszenzintensität des Fluorophors um das 14-fache (Tolman *et al.*, 1974). Durch Einbau von 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin an Position 73 in die tRNA<sup>Phe</sup> von Hefe mit Hilfe von RNA-Ligase T4 erhielt man z. B. eine biochemisch aktive tRNA, bei der die Auflockerung der Sekundär- und Tertiärstruktur (Destacking) nach Zugabe von Magnesiumionen fluoreszenzspektroskopisch zu verfolgen war (Paulsen & Wintermeyer, 1984). Untersuchungen mit der prokaryontischen Initiator-tRNA (tRNA<sup>fMet</sup>) zeigten eine Fluoreszenzabnahme des 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosins nach Einbau an Position 73 der tRNA und eine Fluoreszenzzunahme bei Bindung der entsprechenden aminoacylierten tRNA an die ribosomalen P-Seite. Auch bei diesen Experimenten konnte die Auswirkung der Basenstapelung auf die Fluoreszenz der Reportergruppe beobachtet werden.

Bereits bei Hybridisierung der beiden RNA-Einzelstränge D-A649\_38(1) und  $\epsilon A25$  zur Bildung des funktionellen RNA-Liganden D-A649\_38 $\epsilon A25$ , läßt sich eine Auflockerung der Basenstapelung beobachten. Während das 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin durch Einbau in den Einzelstrang  $\epsilon A25$  einem starken Fluoreszenzquenching unterliegt, kann nach Hybridisierung von  $\epsilon A25$  und D-A649\_38(1) eine Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität um 11,5 % beobachtet werden.

Ein Nachteil der meisten fluoreszenzspektroskopischen Bindungsstudien ist ihr kompetitiver Ansatz. Ein Großteil dieser Studien arbeitet mit modifizierten Targetstrukturen. Ein fluoreszierendes Reportermolekül wird an das Targetmolekül gebunden und ändert somit dessen Struktur, Größe, Oberfläche und eventuell auch dessen Polarität. Dieser Effekt ist um so

---

stärker, je kleiner das eigentliche Targetmolekül ist. Fluoreszenzquenching bei Bindung des modifizierten Targets gefolgt von einem Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität nach dessen kompetitiver Verdrängung durch das ursprüngliche unmodifizierte Targetmolekül oder die Änderung der Fluoreszenzanisotropie bei Komplexbildung geben hierbei Auskunft über das Ausmaß der Bindungsintensität. Es handelt sich dabei um kompetitive Ansätze. Daher sind auch die Bindungskonstanten, die mit diesen Ansätzen erhalten werden, kompetitive oder apparente Bindungskonstanten. Sie können deutlich von den eigentlichen  $K_d$ -Werten der Komplexe der unmodifizierten Bindungspartner abweichen.

Das System, das durch den Einbau von 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenosin in einen RNA-Liganden entwickelt wurde, bietet eine direkte Methode zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch den Einsatz fluoreszierender RNA-Liganden. Durch Nutzung hochaffiner Oligoribonukleotide, die durch Einbau eines fluoreszierenden Nukleotids in ihre Sequenz selbst zum funktionellen Reportersystem wurden, können außerdem erste Aussagen zu Interaktionen zwischen einem Liganden und seinem Target sowie über Konformationsänderungen des Liganden bei der Komplexbildung gemacht werden. Mit dem entwickelten System könnten vor allem die Konzentrationen niedermolekularer Stoffe, die bisher nur durch aufwendige und kostenintensive HPLC-Diagnostikverfahren bestimmbar waren, genau und mit geringerem Aufwand ermittelt werden.