
8. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Vielfalt an Targetmolekülen, für die bereits Nukleinsäureliganden durch *in vitro*-Evolution entwickelt wurden, und durch die Möglichkeit die Stabilitätsprobleme, insbesondere die der Ribonukleinsäuren gegenüber Nukleasen, zum Beispiel durch das Spiegel-Design wirkungsvoll zu umgehen, sind hochaffine Nukleinsäuren zu interessanten Molekülen für therapeutische und diagnostische Zwecke geworden.

Ein wesentlicher Punkt bei der Beurteilung von Liganden hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität zum Targetmolekül ist die sichere Bestimmung der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten der gebildeten Komplexe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zur direkten und nicht radioaktiven Bestimmung von Dissoziationskonstanten zwischen Nukleinsäureliganden und ihrem Zielmolekül entwickelt. Durch den Austausch von Adenosin durch 1,N⁶-Ethenoadenosin, eines fluoreszierenden Derivats des natürlich vorkommenden Nukleotids Adenosin, in eine Ribonukleinsäure mittels automatisierter Phosphoramidit-Festphasensynthese konnte ein RNA-Ligand hergestellt werden, der zusätzlich zu seinen bindenden Eigenschaften selbst als Signalmolekül zur fluorimetrischen Detektion dient. Das Problem der geringen Stabilität des Fluorophors in basischem Milieu konnte durch den Einsatz von Phosphoramiditen mit leicht abspaltbaren Schutzgruppen an den Aminofunktionen und daraus folgenden geringen alkalischen Entschützungszeiten umgangen werden. Die durch direkte fluorimetrische Titration erhaltenen Dissoziationskonstanten sind mit denen vergleichbar, die durch die nichtkompetitive Gleichgewichtsdialyse erhalten wurden. Durch den Austausch des Adenosins an verschiedene Positionen eines Nukleinsäureliganden können zudem erste Aussagen über seine Beteiligung am Bindungsvorgang bei der Komplexbildung gemacht werden.

Das entwickelte Verfahren kombiniert die Methode der *in vitro*-Evolution von Nukleinsäuren mit fluorometrischen Bestimmungsmethoden. Durch eine nachfolgende Synthese des entsprechenden fluoreszierenden L-RNA-Liganden gegen das natürlich vorkommende D-Adenosin (Spiegel-Design) würde ein potentes nichtradioaktives und nukleasestabiles Diagnostikum zur Verfügung stehen.

SUMMARY

High affinity nucleic acid ligands have been developed against a variety of target molecules. By finding a way to increase their stability against nucleases e.g. by using the mirror-design these ligands became very interesting molecules for therapeutic and diagnostic uses.

The exact determination of the binding or dissociation constant of a ligand target complex is important to characterise the affinity and specificity of a ligand to its target molecule.

This work describes a system for the direct and non radioactive determination of dissociation constants between nucleic acid ligands and their target molecule. By exchanging an adenosine of a RNA ligand with an ethenoadenosine, a fluorescent derivative of adenosine, using automated phosphoramidite solid phase synthesis a fluorescent RNA ligand has been developed. This ligand binds with high affinity to its target molecule and works also as signal for fluorescent detection. By using phosphoramidites with protection groups that can be easily cleaved in alkaline milieu the stability of the fluorophore during deprotection was increased dramatically. The dissociation constants determined by direct fluorescent titration correspond to those determined by the non competitive equilibrium dialysis. By introducing ethenoadenosine to different adenosine positions within a nucleic acid ligand first predictions about the role of adenosine at those positions upon the formation of the complex can be made.

The developed method combines the *in vitro* evolution of high affinity nucleic acids with fluorescent assays. The synthesis of the corresponding fluorescent L-RNA ligand against the natural D-adenosine (mirror-design) would result in a potent non radioactive and nuclease stable diagnostic agent.