

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neues Modifikationsinterferenzverfahren entwickelt. Die Grundlage dieses Verfahrens bildet die Verwendung von 3'-Phosphorothiolaten als Marker für die zu untersuchende Modifikation. Der Vorteil gegenüber den bisher bestehenden Interferenzverfahren liegt, darin daß der Marker an einer Position sitzt, die nicht aktiv an der Funktion oder der Strukturbildung von RNA-Molekülen beteiligt ist. Darüberhinaus läßt sich die Schwefel-Phosphorbindung selektiv und quantitativ in Gegenwart der nativen Phosphordiesterbindung spalten. Dadurch lassen sich auftretende Interferenzeffekte direkt aus den Bandenmustern quantitativ bestimmen.

Die neue Methode wurde mittels chemischer Festphasensynthese dargestellter partiell phosphorothiolat-modifizierter Substratstränge des Hammerhead-Ribozyms etabliert. Die Synthesebedingungen für den vollständigen wie partiellen Einbau von 3'-phosphorothiolat-modifizierten Amiditen und die Quantifizierung der Silberspaltung wurde anhand einer 12 Nukleotide langen Modell-RNA durchgeführt. Die gefundenen Bedingungen wurden dann auf die Synthese des 32-mer Hammerhead-Substratstranges übertragen.

Mit der neuen Interferenzmethode wurden die 2'-Hydroxylgruppen der Uridine im konservierten Bereich des Hammerheads untersucht. Für die Position U16.1 konnte kein Interferenzeffekt, für die Position U7 ein leichter und für Position U4 ein starker Interferenzeffekt beobachtet werden. Die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse konnte durch Experimente mit singular desoxymodifizierten Substratstränge bestätigt werden. Die kinetischen Konstanten wurden unter *single turnover* Bedingungen ermittelt. In Kontrollexperimenten, bei denen der Substratstrang nur die 3'-Phosphorothiolat Modifikation trug, konnte kein Einfluß der Schwefel-Phosphor-Bindung auf die Hammerhead-Spaltung festgestellt werden.

Die hier vorgestellte neue Interferenzmethode läßt sich allgemein auf funktionelle Nucleinsäuren anwenden. Es dient zum einen der Identifikation von essentiellen funktionellen Gruppen und somit der Identifikation von z.B. aktiven Zentren von Ribozymen oder bindenden Regionen von Aptameren und zum anderen können funktionelle Nucleinsäuren gezielt gegen Nucleasen resistent gemacht werden.