

# Inhalt

I. Einleitung	1
1.1 In vitro Selektion von Ribonucleinsäuren	2
1.2 Die direkte Selektion	4
1.3 Die direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden	6
1.4 Methoden zur Einführung von Reaktanden in RNA: Darstellung ternärer RNA-Konjugate	7
1.5 Die enzymatische Nucleotidsynthese	8
1.6 Das Hammerheadribozym und Fluoreszenzenergietransfer-Messungen	9
1.7 Allosterische Ribozyme	11
2. Aufgabenstellung	14
3. Material und Methoden	15
3.1.1 Oligodesoxyribonucleotide	15
3.1.2 Oligoribonucleotide	15
3.2 Standardmethoden und Reagenzsysteme	16
3.3 T7-Transkription	17
3.4 Linkersynthese	18
3.5 Linkerderivatisierung	19
3.6 Ligation mittels T4-RNA-Ligase	20
3.7 PRPP-Aktivitätstest	21
3.8 Inkubationsschritt bei den Selektionen	21
3.9 Gelpermeationschromatographie	21
3.10 Periodatoxidation	22
3.11 Immobilisierung	22
3.12 Photospaltung	23
3.13 N-Acryloyl-3-aminophenylborsäure (APB)	23
3.14 Copolymerisation von Acryloyl-3-aminophenyl-borsäure (APB) in Polyacrylamidgele	24
3.15 Reverse Transkription	24
3.16 PCR	25
3.17 Durchführung der Selektionen	26
3.18 1-O-Methyl-2,3-isopropyliden-D-ribofuranosid	27

3.19	Ribose-5-thiophosphat	27
3.20	Synthese von 5-Thio-PRPP	28
3.21	Synthese des Ribozyms SWI58	29
3.22	Die Hammerheadspaltung des Ribozyms HH76 in Gegenwart von Theophyllin	30
3.23	Fluoreszenzmessungen	30
4.	Ergebnisse	32
4.1	Entwicklung einer Selektionsstrategie	32
4.1.1	Konstruktion der RNA-Bibliothek	32
4.1.2	Allgemeines Selektionsschema und Konstruktion des Linkers	33
4.1.3	Linkerderivatisierung	35
4.1.4	Ligation	37
4.1.5	Evaluierung geeigneter Ankergruppen	38
4.1.6	Periodatoxidation und Immobilisierung von cis-diol-Gruppen	41
4.1.7	Borsäurehaltige Gele	45
4.1.8	Durchführung der Selektion	47
4.2	Entwicklung eines dynamischen Verfahrens zur Bestimmung von Konzentrationen kleiner organischer Moleküle	50
5.	Diskussion	58
5.1	Versuche zur in vitro Selektion	58
5.2	Entwicklung eines Sensorsystem zur Bestimmung von Theophyllinkonzentrationen	61
6.	Zusammenfassung	65
7.	Summary	67
8.	Anhang	69
	Abkürzungsverzeichnis	69
	Geräte und Chemikalien	71
	Lebenslauf	74
	Publikationen	75
9.	Literaturverzeichnis	76