Inhaltsverzeichnis

1. AUFGABENSTELLUNG	5
2. EINLEITUNG	7
2.1. Nukleinsäuren	7
2.1.1. Das zentrale Dogma der Molekularbiologie	7
2.1.2. Ribonukleinsäuren	10
2.2. Die RNA-Welt	12
2.3. <i>In vitro</i>-Evolution von Nukleinsäuren durch SELEX	15
2.4. <i>In vitro</i>-Evolution von Antikörpern oder Peptiden	19
2.5. Chemische Modifikation von Ribonukleinsäureliganden	21
2.5.1. Verbesserung der Stabilität von RNAs in biologischen Lösungen	21
2.5.2. Modifikationen zur Struktur- und Funktionsuntersuchung	22
2.6. Spiegel-Design	23
2.7. Bindungsstudien	25
2.7.1. RNA-Liganden	25
2.7.1.1. Gleichgewichtsdialyse und Gleichgewichtszentrifugation	25
2.7.1.2. Mobility Gel Shift Assay	25
2.7.1.3. Analytische Affinitätschromatographie	26
2.7.1.4. Fluorimetrisch mit Hilfe eines Biosensors	26
2.7.1.5. Fluoreszenzdepolarisationsstudien	26
2.7.2. Antikörper	27
2.7.2.1. Surface Plasmon Resonance (SPR)	27
2.7.2.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	28
2.7.2.3. Fluorescence ImmunoAssay (FIA)	28
2.8. Adenosin und seine physiologische Bedeutung	29

3. MATERIALIEN	31
4. METHODEN	37
4.1. Synthese und Entschützung von Nukleinsäuren	37
4.1.1. Automatisierte Festphasensynthese der Oligoribonukleotide	37
4.1.2. Entschützung der Syntheseprodukte	39
4.1.2.1. Alkalische Entschützung	40
4.1.2.2. Entfernung der Silylschutzgruppen	41
4.2. Aufreinigung von Nukleinsäuren	41
4.2.1. Reversed Phase HPLC	41
4.2.2. Gelelektrophorese	43
4.2.2.1. Gelelektrophoretische Methoden	43
4.2.2.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	44
4.2.3. Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen	45
4.2.3.1. Fluoreszenzdetektion nach Färbung mit Ethidiumbromid	45
4.2.3.2. „Stains-All“ Methode zur Färbung von Polyacrylamidgelen	46
4.2.3.3. Detektion durch UV-Shadowing	46
4.2.4. Gelelution von Nukleinsäuren	47
4.2.5. Gelfiltration	47
4.2.6. Ethanolfällung	48
4.3. Enzymatische Spaltung	49
4.3.1. Nukleosidanalyse mit Ribonuklease T2 und alkalischer Phosphatase	49
4.3.2. Enzymatische Spaltung durch Phosphodiesterase	50
4.4. Tritiierung von L-Adenosin	51
4.5. Spektralphotometrische Bestimmungen	51
4.5.1. Grundlagen der UV-Vis-Spektroskopie	51
4.5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	52
4.5.3. Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligoribonukleotiden	52

4.6. Bestimmung der Dissoziationskonstanten	53
4.6.1. Gleichgewichtsdialyse	53
4.6.2. Fluoreszenztitration	54
4.6.2.1. Fluoreszenzspektroskopische Methoden	54
4.6.2.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten	55
5. ERGEBNISSE	57
5.1. Synthese und Charakterisierung der D-A649_38 Derivate	57
5.1.1. Chemische Synthese der Oligoribonukleotide	57
5.1.2. Alkalische Entschützung der Syntheseprodukte	60
5.1.3. Nukleosidanalyse der Syntheseprodukte	63
5.1.4. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten	66
5.2. Bindungskonstantenbestimmung durch Gleichgewichtsdialyse	68
5.3. Fluoreszenzspektroskopische Verfahren	72
5.3.1. Theorie der Fluoreszenzspektroskopie	72
5.3.2. Fluoreszenzspektrometer	75
5.3.3. 1,N ⁶ -Ethenoadenosin	76
5.3.3.1. Änderung der Fluoreszenzintensität durch Einbau in den RNA-Liganden	77
5.3.4. Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenztitration	78
6. DISKUSSION	83
7. AUSBLICK	95
8. ZUSAMMENFASSUNG	97
9. LITERATUR	99
ANHANG	107
Abkürzungen und Einheiten	107
Lebenslauf	109
Eigene Publikationen	110