

6. Zusammenfassung

Die katalytische Aktivität von Ribonucleinsäuren ist von großer Bedeutung für mögliche präbiotische Prozesse. Dabei wird die Bildung von C-N-Bindungen als essentieller Bestandteil im Metabolismus einer hypothetischen RNA-Welt angesehen. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Selektionsschemas zur Isolierung neuer Ribozyme, welche die N-glycosidische Bindungsknüpfung zwischen PRPP und einer Nucleobase katalysieren sollen, sowie der dafür benötigten Technologien. Diese katalytische RNA sollte aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek mit Hilfe der *in vitro* Selektionstechnik isoliert werden. Es wurde dazu das Prinzip der direkten Selektion erweitert zur "direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden".

Dieses neue Selektionsschema erfordert die ortsspezifische Einführung eines der beiden Reaktionspartner über einen Linker an sämtliche RNA-Moleküle der RNA-Bibliothek. Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur enzymatischen 3'-Modifizierung von RNA entwickelt, die auf der Einführung von synthetischen Linkern durch die T₄-RNA-Ligase beruht. So konnten Nicotinsäure und Uracil-6-carbonsäure über Polyethylenglycol als flexiblen Linker direkt und spezifisch an den 3'-Terminus der RNA gebunden werden.

Diejenigen RNA-Konjugate, welche die Reaktion zwischen der gebundenen Nucleobase und dem aktivierten Zuckerphosphat katalysierten, erwarben automatisch eine cis-diol-Gruppe. Nach diesem Prinzip konnte die katalytische RNA nach Periodatoxidation und Immobilisierung mit einer Hydrazidfestphase und anschließender Laserspaltung bzw. durch Affinitätsgelelektrophorese von den inaktiven RNA-Spezies abgetrennt werden. Der RNA-Teil dieser isolierten Produkte wurde anschließend enzymatisch amplifiziert und erneuten Cyclen aus Transkription, Konjugation, Inkubation und Selektion unterworfen. Es konnten jedoch keine katalytischen RNA-Moleküle angereichert werden.

Aufgrund einer ganzen Reihe von Eigenschaften ist RNA prädestiniert für den Einsatz als Biosensor: sie zeichnet sich durch präzise molekulare Erkennung, schnelle Ausbildung von Strukturen und enzymatische Funktion aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein dynamisches System zur direkten und nicht radioaktiven Bestimmung von Konzentrationen des Theophyllins auf der Basis des Theophyllinaptamers und des Hammerheadribozoms entwickelt. Durch den Einsatz des Fluoreszenzenergieübertragungsprinzips konnte die zeitaufgelöste kinetische Analyse einer der Theophyllinkonzentration entsprechenden Ribozymaktivität durchgeführt werden.

Unser Sensorsystem besteht aus einem Ribozymstrang und einem zweifach gelabelten Substratstrang, der in Anwesenheit von Theophyllin selektiv gespalten wird. Bei Anregung mit Licht der Fluorescein typischen Wellenlänge wird Fluoreszenz freigesetzt. Dieser Fluoreszenzanstieg korreliert mit der Spaltungsgeschwindigkeit und damit der anwesenden Theophyllinkonzentration. Die Nachweisgrenze lag bei 0,01 - 2 mM, wobei Coffein dieses System unter den hier gewählten Bedingungen nicht beeinflusste.

Diese auf der Basis von RNA-Technologie und modernen Fluoreszenzdetektionsverfahren entwickelte Methode zur Konzentrationsbestimmung bietet Raum für weiterführende Verbesserungen und Verfeinerungen wie auch für die Erweiterung auf eine Vielzahl von anderen Analyten.