

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN

Standardchemikalien und Laborgeräte wurden bezogen von

Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Merck KG, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Greiner Bio-One GmbH, Essen
 Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden

Radioaktiv markierte Nukleotide: Amersham Biosciences, Freiburg
 Hartmann Analytic, Braunschweig

Restriktionsenzyme: New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Medien und Chemikalien für Zellkultur: PAA, Linz, Österreich

Kits zur Plamidisolation: Qiagen, Hilden
 Amersham Biosciences, Freiburg

Geräte

Brutschrank	Heracell, Heraeus-Kendro Lab Products, Langenselbold
Zellkulturbank	Herasafe, Heraeus-Kendro Lab Products, Langenselbold
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX50 S1F, Hamburg
Geldokumentation	Quantity One, Biorad Laboratories, München
Heizschrank	Heraeus/Beckmann 5042, München
Kühlzentrifuge	Heraeus/Beckmann J2-21, München
PhosphoImager	Molecular Dynamics Storm 840 Imager
Spektrophotometer	Hewlett Packard Spectrophotometer HP 8452, Böblingen
Szintillationszähler	Beckmann LS 6000 SC, München
Thermocycler	UNO II Thermoblock, Biometra, Göttingen Light Cycler, Roche Diagnostics, Mannheim

3.2 OLIGONUKLEOTIDE UND SIRNAS

Unmodifizierte Oligodesoxynukleotide wurden bezogen von MWG-Biotech AG, Ebersberg, IBA GmbH, Göttingen und TIB MOLBIOL, Berlin. Phosphorothioate wurden von MWG hergestellt. Oligonukleotide mit 2'-O-methyl-Modifikationen und 3'-3'-invertiertem Thymidin sowie RNA-Oligonukleotide kamen von IBA. LNA-enthaltende Oligonukleotide wurden erhalten von Proligo, Boulder, CO, USA.

Tabelle 3.1 enthält die Sequenzen der verwendeten DNAzyme, AS-ODNs und siRNAs. Die GenBank-Zugangsnummern der Ziel-Gene und -Viren sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die siRNAs gegen die CBV-3 RdRP wurden als SMART pool package auf der Basis der Dharmacon Kriterien erworben (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). siRNAs mit symmetrischen Überhängen wurden von Dharmacon, MWG oder IBA bezogen. In der Tabelle 4.3 sind die Zielsequenzen für die siRNAs gegen CBV-3 angegeben. Die Kontroll-siRNA, die weder im menschlichen Genom noch im Virusgenom Entsprechungen hat, kam von Qiagen, Hilden.

3.2.1 Sequenzen

DNAzym DH5	CCG GGG AAA GGC TAG CTA CAA CGA AGA AGT GCT
DNAzym DH5 inaktiv	CCG GGG AAA GGC <u>TAC</u> CTA CAA CGA AGA AGT GCT
Oligonukleotid H5	CCG GGG AAA CAG AAG TGC T
DNAzym DV15	G TCA TGA GGC TAG CTA CAA CGA GGT TAG G
DNAzym DV28	AGC TCC AGA GGC TAG CTA CAA CGA ATG TGG AAT
Oligonukl. V28	AGC TCC AGA CAT GTG GAA T
DNAzym DCo5	CCG GGG TAA GGC TAG CTA CAA CGA AGA AGT GCT
Kontroll-siRNA Ziels.	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U
VsiRNA1 Zielsequenz	GCG CAU CUU CUA CUU CAA C
PsiRNA2 Zielsequenz	GUG GUC CUG CUG AAG AAG G

Tab. 3.1: Sequenzen der verwendeten DNAzyme, AS-ODNs und siRNAs mit Ausnahme der siRNAs gegen CBV-3 (siehe dafür Tabelle 4.3).

Bezeichnung	Gen-Bank Acc. No.
Humanes Rhinovirus 14 (HRV-14)	X01087
Coxsackievirus A21 (CAV-21)	NC001428
Coxsackievirus B3 (CBV-3)	M33854
Vanilloid Rezeptor der Ratte (VR1; TRPV1)	AF029310
Humane Pim-1 Kinase	NM018034.1

Tab. 3.2: Gen-Bank Zugangsnummern der relevanten Gene und Viren.

3.2.2 Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden durch mindestens zwei unabhängige Messungen der Extinktion bei 260 nm im HP Spektrophotometer 8452A bestimmt. Extinktionskoeffizienten für Oligonukleotide wurden näherungsweise aus Literaturdaten berechnet (Gray *et al.*, 1995). Für modifizierte Oligonukleotide wurden dabei dieselben Werte angenommen wie für unmodifizierte DNA- bzw. RNA- Oligonukleotide.

Für die Konzentrationsbestimmung längerer Nukleinsäurestränge, bei denen eine Berechnung auf die angegebene Weise unpraktisch wäre, wurden folgende Näherungen zugrundegelegt:

dsDNA: 1 OD = 50 µg/ml

ssDNA: 1 OD = 33 µg/ml

ssRNA: 1 OD = 40 µg/ml

Durchschnittliche Molmasse RNA-Nukleotid: 337 g/mol

Durchschnittliche Molmasse DNA-Nukleotid: 325 g/mol

3.3 KLONIERUNGEN UND *IN VITRO*-TRANSKRIPTIONEN

Klonierung und in vitro-Transkription picornaviraler 5'-NTRs

In einem freundlicherweise von D. Gül, AG Prof. Heinz Zeichhardt, Charité, Berlin zur Verfügung gestellten Plasmid befanden sich die ersten 840 Basen der cDNA eines infektiösen Voll-Längen cDNA-Klones von HRV-14 in einem pCR2.1 Vektor (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

cDNAs der 5'-NTRs von Coxsackievirus A21 (CAV-21) und Coxsackievirus B3 (CBV-3) wurden durch reverse Transkription und Amplifikation viraler RNA mit den in Tabelle 3.3

angegebenen PCR-Primern erhalten. Die cDNAs wurden in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO Vektoren (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Die Identität der Vektoren wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) verifiziert.

Bezeichnung	Position im Genom	Sequenz
CBV-3 RdRP fw	5911-5931	<u>TGA</u> AGG TGA AAT AGA ATT TAT TG
CBV-3 RdRP rev	7297-7277	AAA GGA ATC CAA CCA CTT CC
CBV-3 RdRP Mutationsprimer 2	6301-6352	CCT CTC TAA GAA GAC TAA GGA CCG AAC AAA GTT AAA GGA ATG
CBV-3 RdRP Mutationsprimer 4	6727-6760	CCA TCA CCT GTA CAG GGT TAA ACA TTA CTT TGT G
CAV-21 5'-NTR fw	1-20	TTA AAA CAG CTC TGG GGT TG
CAV-21 5'-NTR rev	714-696	CCA TTT GCA CTG ACT ATT GTG
CBV-3 5'-NTR fw	1-20	TTA AAA CAG CCT GTG GGT TG
CBV-3 5'-NTR rev	742-724	CCA TTT TGC TGT ATT CAA CTT A

Tab. 3.3: Verwendete Primer für Klonierungen viraler cDNA und ortsspezifische Mutagenese. Die unterstrichenen Basen entsprechen einem Translations-Stopp-Codon (Erläuterungen siehe Text).

Vor der *in vitro*-Transkription wurden die Plasmide durch Restriktionen mit Bam HI (HRV-14) bzw. Eco RV (CAV-21, CBV-3) linearisiert. Die Transkriptionen wurden durchgeführt mit dem RiboMAX Large Scale Production System von Promega, Madison, WI, USA, entsprechend den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Transkripte enthielten 876 Basen im Falle von HRV-14, 797 Nukleotide für CAV-21 bzw. 825 Nukleotide (CBV-3). Die 2600 Basen lange mRNA des Vanilloidrezeptors Typ 1 (VR1) wurde aus einem von der Grünenthal GmbH, Aachen, zur Verfügung gestellten cDNA-Klon transkribiert.

Klonierung von CBV-3 RdRP und Einführung von Punktmutationen

Die cDNA der RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRP) von CBV3 wurde durch reverse Transkription und Amplifikation viraler RNA mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Primern erhalten. Die unterstrichenen Basen bei CBV-3 RdRP fw entsprechen einem zusätzlichen Translations-Stopp-Codon. Anschließend wurde die cDNA in einen pcDNA3./NT-GFP-TOPO Vektor kloniert.

Zur Einführung von Punktmutationen in die cDNA der RdRP wurde ein Fragment des beschriebenen Vektors in pUC19 kloniert, um ein kleineres und damit besser zu bearbeitendes

Plasmid zu erhalten. Die Substitutionen wurden mit dem QuikChange *site-directed mutagenesis kit* von Stratagene, La Jolla, CA, USA nach den Anweisungen des Herstellers eingeführt. Die Sequenzen der Primer mit den einzuführenden Punktmutationen sind ebenfalls Tabelle 3.3 zu entnehmen. Der Mutationsprimer 2 enthielt eine T-G Substitution, der Mutationsprimer 4 einen A-T Austausch jeweils genau in der Mitte der Zielsequenz der entsprechenden siRNA.

Klonierung straight-loop

Sense- und Antisense- Oligodesoxynukleotide wurden hergestellt, die jeweils einer der 19-meren siRNA Zielsequenzen entsprachen und Überhänge für Kpn I- und Xba I-Restriktionsstellen enthielten. Die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. 100 pmol der jeweils zusammengehörigen Stränge wurden durch vierminütiges Erhitzen auf 95°C in *annealing*-Puffer (100 mM Kaliumacetat; 30 mM HEPES-KOH pH 7,4; 2 mM Magnesiumacetat) und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur zusammengefügt. Die DNA-Doppelstränge wurden dann mit T4 Polynukleotidkinase (Promega) phosphoryliert und mit Quick Ligase (NEB) in einen pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO Vektor kloniert, der zuvor mit Kpn I und Xba I geschnitten und mit Alkalischer Phosphatase (NEB) dephosphoryliert worden war.

Klonierung der siRNAs in pSilencer und SiDEx

DNA Oligonukleotide, die für *short hairpin* RNAs (shRNAs) codierten, wurden entsprechend den Anforderungen für die Klonierung in den pSilencer 2.1-neo Expressionsvektor (Ambion) aufgebaut. Um die Herstellung eines Doppelvektors zu ermöglichen, wurde eine zusätzliche Eco RI-Restriktionsstelle hinter das Transkriptions-Stoppsignal in der cDNA für siRdRP4 eingefügt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.4 angegeben. Die Stränge wurden zusammengefügt, und der Vektor wurde dephosphoryliert wie im vorhergehenden Absatz beschrieben. Zur Ligation in den pSilencer 2.1-U6 neo Vektor wurde T4 Ligase (Promega) eingesetzt. Die erhaltenen Plasmide wurden als pSiR2 und pSiR4 bezeichnet.

Zur Erzeugung des Doppel-Expressionsvektors SiDEx wurden das „Donorplasmid“ pSiR4 und das „Akzeptorplasmid“ pSiR4 mit Eco RI verdaut. Aus pSiR4 wurde so ein Fragment von etwa 400 Basenpaaren Länge herausgeschnitten, das aus dem U6-Promotor und der cDNA für die shRNA4 bestand. Dieses Fragment wurde in den mit Eco RI linearisierten pSiR2-Vektor kloniert.

siRNA2 Zielsequenz in pcDNA3.1/CT-GFP TOPO	sense	GAC TAA GGA CCT AAC AAA GTT
	antisense	CTA GAA CTT TGT TAG CTG CTT AGT CGT AC
siRNA4 Zielsequenz in pcDNA3.1/CT-GFP TOPO	sense	CTG TAC AGG GAT AAA CAT TAC
	antisense	CTA GGT AAT GTT TAT CCC TGT ACA GGT AC
shRNA2 in pSilencer	sense	GAT CCC GCT AAG GAC CTA ACA AAG TTT TCA AGA GAA ACT TTG TTA GGT CCT TAG TTT TTT GGA AA
	antisense	AGC TTT TCC AAA AAA CTA AGG ACC TAA CAA AGT TTC TCT TGA AAA CTT TGT TAG GTC CTT AGC GG
shRNA4 in pSilencer	sense	GAT CCC GTA CAG GGA TAA ACA TT ACTT CAA GAG AGT AAT GTT TAT CCC TGT ACT TTT TTG GAA GAA TTC A
	antisense	AGC TTG AAT TCT TCC AAA AAA GTA CAG GGA TAA ACA TTA CTC TCT TGA AGT AAT GTT TAT CCC TGT ACG G
VR1 Zielsequenz "straight" in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG CGC ATC TTC TAC TTC AAC TT
	antisense	CTA GAA GTT GAA GTA GAA GAT GCG CTT GTA C
VR1 Zielsequenz „compl“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG TTG AAG TAG TTG ATG CG TT
	antisense	CTA GAA GCG CAT CTT CTA CTT CAA CTT GTA C
VR1 Zielsequenz „hp21“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG CGC ATC TTC TAC TTC AAC TTT TCG AAG TTG AAG TAG AAG ATG CGC
	antisense	CTA GGC GCA TCT TCT ACT TCA ACT TCG AAA AGT TGA AGT AGA AGA TGC GCT TGT AC
VR1 Zielsequenz „hp5'16“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG CGC ATG TTC TAC TTC AAC TTT TCG AAG TTG A
	antisense	CTA GTC AAC TTC GAA AAG TTG AAG TAG AAG ATG CGC TTG TAC
VR1 Zielsequenz „hp5'11“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG CGC ATC TTC TAC TTC AAC TTT TCG AAG TTG AAG TAG
	antisense	CTA GCT ACT TCA ACT TCG AAA AGT TGA AGT AGA AGA TGC GCT TGT AC
VR1 Zielsequenz „hp5'6“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG CGC ATC TTC TAC TTC AAC TTT TCG AAG TTG AAG TAG AAG AT
	antisense	CTA GAT CTT CTA CTT CAA CTT CGA AAA GTT GAA GTA GAA GAT GCG CTT GTA C
VR1 Zielsequenz „3'16“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	CGC TTT TCG AAG CGC ATC TTC TAC TTC AAC TT
	antisense	CTA GAA GTT GAA GTA GAA GAT GCG CTT CGA AAA GCG GTA C
VR1 Zielsequenz „hp3'11“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AGA TGC GCT TTT CGA AGC GCA TCT TCT ACT TCA ACT TCA
	antisense	CTA GTG AAG TTG AAG TAG AAG ATG CGC TTC GAA AAG CGC ATC TGT AC
VR1 Zielsequenz „hp3'6“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	GTA GAA GAT GCG CTT TTC GAA GCG CAT CTT CTA CTT CAA CTT CA
	antisense	CTA GTG AAG TTG AAG TAG AAG ATG CGC TTC GAA AAG CGC ATC TTC TAC GTA C
RdRP Zielsequenz „hp21“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG TAC AAA ACT TC CAC CTA TTT TCG AAT AGG TGG AAA GTT TTG TAC TT
	antisense	CTA GAA GTA CAA AAC TTT CCA CCT ATT CGA AAA TAG GTG GAA AGT TTT GTA CTT GTA C
Pim1 Zielsequenz „straight“ in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	sense	AAG TGG TCCC TGC TGA AGA AGG TT
	antisense	CTA GAA CTT TCT TCA GCA GGA CCA CTT GTA C

Tab. 3.4: Oligonukleotide für die Klonierungen der Zielsequenzen.

3.4 AKTIVITÄTSMESSUNGEN AN DNAZYMEN

3.4.1 RNase H Assay

100 nM mRNA wurden mit 500 nM AS-ODN und 0,4 Units RNase H (Promega) in einem Endvolumen von 10 µl im vom Hersteller gelieferten RNase H-Puffer inkubiert. Um unspezifischen Abbau zu vermeiden, wurden 10 Units RNasin/Ansatz (Promega) zugegeben. Alle Reaktionen wurden nach 7,5 Minuten durch den Zusatz von EDTA in einer Endkonzentration von 83 mM beendet. Die Abbauprodukte wurden auf einem Agarosegel von intaktem Oligonukleotid getrennt, und die Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Quantity One Programm (Bio-Rad, München). Um RNase H-Induktion durch das schwächer bindende inaktive DNAzym zu verfolgen, wurde die Menge an RNase H auf 4 Units/Ansatz erhöht und die Reaktion erst nach 30 Minuten beendet.

3.4.2 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

1 pmol der 19-meren Ziel-RNA wurde mit 5 Units T4-Polynukleotidkinase (Promega, Madison, WI, USA) unter Zusatz von 10µCi [γ -³²P]ATP 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die markierte RNA wurde anschließend über ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgereinigt. Die Voll-Längenbande wurde durch Autoradiographie detektiert, ausgeschnitten, und die RNA wurde durch 45 Minuten Inkubation bei 80°C in Elutionspuffer (0,3 M Natriumacetat pH 5,5) aus dem Gel herausgelöst. Schließlich wurde die RNA durch Zugabe von 2,5 Volumina 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt, durch Zentrifugation bei 4°C pelletiert und in Wasser aufgenommen. Die Aktivität der markierten RNA wurde durch Messung im Szintillationszähler bestimmt.

3.4.3 Kinetische Messungen an DNAzymen

Die Aktivitäten von DNAzymen mit unterschiedlichen Modifikationen in den Bindungsarmen oder im katalytischen Zentrum wurden unter *multiple turnover* Bedingungen bestimmt. 1 µM der 19-meren Ziel-RNA wurde mit 10000 c.p.m. radioaktiv markierter RNA vermischt und mit 10 nM DNAzym bei 37°C in Ribozympuffer (10 mM MgCl₂; 50 mM Tris-HCl pH 7,5) inkubiert. Vor dem Zusammengeben wurden RNA und DNAzym separat durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C denaturiert. Die Spaltungsreaktion wurde nach 20 Minuten durch den Zusatz von EDTA (Endkonzentration 83 mM) und Kühlung auf Eis beendet. Die Proben

wurden anschließend fünf Minuten bei 65°C denaturiert, und Substrat und Spaltprodukte wurden über ein 20%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Anteil an gespaltener RNA wurde durch Autoradiographie auf dem Molecular Dynamics Storm 840 Phosphoimager quantifiziert.

Ähnliche Experimente wurden auch mit der Voll-Längen RNA als Substrat durchgeführt. Dazu wurden 100 nM unmarkierte Ziel-RNA verwendet, die Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Auswertung wurde das Quantity One Programm eingesetzt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Kinetiken der DNAzyme

Kinetische Messungen der enzymatischen Aktivität von DNAzymen gegenüber langen Ziel-RNAs wurden in Ribozympuffer (s.o.) unter Zusatz von 10 Units RNasin/Ansatz zur Vermeidung von unspezifischem Abbau durchgeführt. Die DNAzyme wurden zwei Minuten bei 65°C denaturiert und dann langsam auf 37°C abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des DNAzyms zu 100 nM Ziel-RNA gestartet. Die DNAzym Konzentration betrug dabei 1 μ M für *single turnover* Experimente und 10 nM im *multiple turnover*. Während der ersten 10% der Reaktion (Substratüberschuß) oder über einen längeren Zeitraum (Enzymüberschuß) wurden zu definierten Zeitpunkten Proben abgenommen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von EDTA und Abkühlen auf Eis wie oben beschrieben beendet. Die Spaltreaktion wurde durch Agarosegelelektrophorese, Anfärben der Banden mit Ethidiumbromid und Quantifizierung der Bandenstärke mit Quantity One analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit dem Programm Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA). Durch die Daten der *multiple turnover*-Versuche wurde eine Ausgleichsgerade gelegt, um die Anfangsgeschwindigkeit (*initial velocity*, v_{init}) zu erhalten. Die Ergebnisse der *single turnover*-Meßreihen wurde mit einer Exponentialfunktion ersten Grades gefittet, wobei sich die beobachtete Geschwindigkeitskonstante, k_{obs} , und die Menge an RNA ergaben, die laut mathematischer Vorhersage im Gleichgewicht ungespalten bleiben würde. Angegebene Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bestimmung von k_{cat} und K_M für DNAzyme

0,1 nM DNAzym und sechs Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an 19-merer Ziel-RNA zwischen 1 nM und 250 nM (Endkonzentrationen) wurden zunächst zwei Minuten bei 85°C denaturiert und dann auf 37°C gestellt. Die Lösungen an Ziel-RNA enthielten

500 c.p.m./ μl 5'-radioaktiv markierte RNA. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des DNAzyms zu den jeweiligen RNA-Ansätzen gestartet. Der Puffer enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 und 10 mM MgCl_2 . Während der ersten 10% der Reaktion wurden aus jedem Ansatz mindestens vier Aliquots abgenommen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 4 μl 90% Formamid und 20 nM EDTA beendet. Die Auftrennung der intakten und geschnittenen RNA erfolgte über ein 20%-iges Polyacrylamidgel, die Banden wurden durch Autoradiographie mit dem Storm Phosphoimager detektiert. Anfangsgeschwindigkeiten wurden für jede Substratkonzentration ermittelt. Schließlich wurden k_{cat} und K_M durch Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten über der Substratkonzentration und einen hyperbolischen Fit ermittelt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Schmelztemperaturmessungen

Schmelztemperaturen der DNAzym-Zielmolekül Hybride wurden mit dem HP Spectrophotometer 8452A bestimmt. 1,5 μM DNAzym und die gleiche Menge der komplementären 19 Nukleotide langen Ziel-RNA wurden fünf Minuten bei 95°C in T_M -Puffer inkubiert (10 mM Natriumphosphat; 0,1 mM EDTA; 100 mM Natriumchlorid pH 7,0). Nach langsamer Abkühlung auf 12°C wurde die Extinktion bei 260 nm über einen Temperaturbereich von 12 bis 90°C gemessen. Die Schmelztemperatur entspricht dem Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve. Angegeben sind Durchschnittswerte aus mindestens je einer Messung bei steigender und einer bei abnehmender Temperatur.

3.5 STABILITÄTSBESTIMMUNGEN VON DNAZYMEN

Stabilitätsmessung in Zellkulturmedium

Die Resistenz von DNAzymen gegenüber nukleolytischem Abbau wurde in Zellkulturmedium bestimmt. 1 μM DNAzym wurde bei 37°C in DMEM (PAA Laboratories, Coelbe) mit 10% fötalem Kälberserum (PAA Laboratories) inkubiert. Über 72 Stunden wurden nach definierten Intervallen Aliquots entnommen. Alle ablaufenden Reaktionen wurden durch Zugabe des gleichen Volumens an 9 M Harnstoff in TBE und Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. Die Oligonukleotide wurden durch Phenolextraktion und anschließende Ethanol-fällung (0,3 M Natriumacetat pH 5,2; 2,5 Volumina Ethanol) bei -20°C über Nacht aufgereinigt. Das Präzipitat wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in Wasser resuspendiert. Nach einem Denaturierungsschritt (fünf Minuten bei 85°C) wurde das

verbliebene Voll-Längen Oligonukleotid von seinen Abbauprodukten über ein 20%-iges Polyacrylamidgel getrennt. Die Dichte der Voll-Längenbande wurde mithilfe des Quantity One Programms ermittelt. Schließlich wurde die Halbwertszeit des jeweiligen DNAzyms durch einen Fit der ermittelten Menge an Voll-Längen DNAzym zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer Exponentialfunktion ersten Grades bestimmt.

Stabilitätsmessung gegen S1 Endonuklease

Um die Stabilität von DNAzymen spezifisch gegen Endonukleasen zu untersuchen, wurden 2 μ M DNAzym mit 0,4 Units S1 Endonuklease (Promega) pro 100 pmol DNAzym im vom Hersteller mitgelieferten Nukleasepuffer (50 mM Natriumacetat pH 4,5; 280 mM NaCl; 4,5 mM ZnSO₄) inkubiert. Zwischen 0 und 180 Minuten wurden mehrere Aliquots abgenommen. Die Reaktion wurde durch dreiminütiges Erhitzen auf 98°C und anschließendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. Die Oligonukleotide wurden mit Ethanol gefällt und weiter behandelt wie für die Stabilitätstests in Zellkulturmedium beschrieben. Für alle Stabilitätsmessungen beschreiben die angegebenen Werte den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

3.6 ZELLKULTURMETHODEN

3.6.1 Zellkulturbedingungen und Transfektionen

Cos-7 Zellen (Affennieren-Fibroblasten) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's *modified Eagle's medium* (DMEM, PAA Laboratories, Coelbe) mit 10% fötalem Rinderserum, 100 μ g/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (Invitrogen) kultiviert. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin vom Boden der Flasche abgelöst, in Medium ohne Antibiotika resuspendiert und in einer Dichte von $0,7 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung in 500 μ l Medium in 24-*well*-Platten ausgesät. Transfektionen und Cotransfektionen wurden mit 2,5 μ l Lipofectamin (Invitrogen) pro Vertiefung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Menge an eingesetztem Zielplasmid betrug, wenn nicht anders angegeben, 0,8 μ g/*well*.

3.6.2 Western Blot

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in den 24-*well*-Platten durch Zusatz von Lysispuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 1,4 M β -Mercaptoethanol; 25% Glycerin;

0,05% Bromphenolblau) aufgeschlossen. Das Lysat wurde fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht, bevor die Proteine über ein 12,5%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Mit einem SemiDry Blotgerät (Peqlab, Erlangen), wurden die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran (Amersham, Freiburg) übertragen. Die Membranen wurden mit GFP-Antiserum aus Kaninchen (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:5000 in Trockenmilch inkubiert. Sekundär-Antikörper waren mit Alkalischer Phosphatase konjugiert (Chemicon, Hampshire, UK) und wurden ebenfalls in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz mit dem CDP-Star-Reagenz von Roche, Mannheim. Um die gleichmäßige Beladung des Gels zu verifizieren, wurden die Membranen nach der Detektion des GFP gestriipt und anschließend mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Aktin behandelt (Chemicon, 1:5000 Verdünnung). Die Quantifizierung der Blots erfolgte mit Quantity One. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.6.3 Cell-Viability Test

HeLa-Zellen wurden in Mehrfach-Ansätzen als konfluenter Zellrasen in einer Dichte von 2.5×10^4 Zellen/Vertiefung auf einer 96-well-Platte in Antibiotika-freiem *Eagle's minimal essential medium* mit 5% fötalem Rinderserum, 20 mM HEPES und 1x non-essential amino acids (GIBCO) 24 Stunden vor dem eigentlichen Experiment ausgesät. Die Transfektion mit Lipofectamin wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden die Transfektionsansätze entfernt, und die Zellen wurden mit 0,1 *multiplicity of infection* (MOI) CBV-3 in serumfreiem Medium inokuliert. Nach dreißig Minuten wurde der virushaltige Überstand abgenommen, und serumhaltiges Medium wurde zugegeben. Der Anteil lebender Zellen in den einzelnen Vertiefungen der Platte wurde zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion mit dem *Cell Proliferation Kit II* (Roche) ermittelt. Lebensfähige Zellen reduzieren dabei ein Tetrazoliumsalz. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion der Proben bei 450 nm gemessen. Diese korreliert mit der Menge an umgesetztem Salz und somit mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen im Ansatz. Angegebene Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Vierfach-Ansätzen, wenn nicht anders angegeben.

3.6.4 Plaque-Assay

HeLa-Zellen wurden in einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/Vertiefung in 6-well-Platten (Costar) in serumhaltigem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden bei 37°C unter 5% CO₂ wurden die

Zellen mit der angegebenen Menge der betreffenden siRNA transfiziert. Vier Stunden später erfolgte die Infektion mit 50 *plaque-forming units* (p.f.u.)/well CBV-3 über 30 Minuten. Danach wurden die Zellen mit serumhaltigem Eagle's-MEM mit 0,7% Agar überschichtet. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen mit 0,025% Neutralrot angefärbt. Virustiter wurden aus der Anzahl der gebildeten Plaques errechnet. Die angegebenen Werte sind Durchschnitt und Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente, die beide als Duplikate durchgeführt wurden.