

### **Telomeraseaktivität auf nukleinsäuremodifizierten Sensoroberflächen**

Peter M. Schmidt, F.W. Scheller\*, F.F. Bier

Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, AG Molekulare Bioanalytik

Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Bergholz-Rehbrücke

\*Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Golm

Registriernummer der Online- Anmeldung:203

#### **Vortrag**

---

Es wird gezeigt, daß durch die Anwendung von Faseroptik und Evaneszenzfeldtechnologie, die Erfassung von Enzymaktivität in Echtzeit ermöglicht wird. Der Einbau der einzelnen Desoxyribonukleotide in die immobilisierte DNA wird so quantitativ erfaßt. Der Einfluß der Immobilisierung auf die Aktivität wird diskutiert. DNA-Polymerasen eignen sich sehr gut für diese kinetischen Studien, da das „An-“ und „Abschalten“ der Aktivität durch Entzug und Zugabe der Nukleotide gesteuert werden kann. Die katalytische Reaktion kann in beobachtbare Teilschritte wie Binden des Substrates und Bilden des Produktes, zerlegt werden.

Die Telomerase ist ein DNA-modifizierendes Enzym, deren Aufgabe darin besteht, die stabilisierenden Enden der Chromosomen, die Telomere, zu verlängern. Ihre Aktivität in „normal“ wachsenden Zellen ist in der Regel sehr gering. Dies führt zu einem ständigem Verkürzen der Telomere bei Zellteilung. Die Zelle „altert“. Bei Unterschreiten einer bestimmten Länge der Telomere wird der Zelltod eingeleitet. In entarteten wachsenden Zellen, wie z. B. Tumorzellen wurde hingegen eine hohe Aktivität der Telomerase beobachtet, die somit der Verkürzung der Telomere entgegenwirkt und deren programmierten Zelltod verhindert. Diese Beobachtung liess einen Zusammenhang zwischen Cancerogenität und der Telomeraseaktivität als Marker vermuten. Basierend auf dieser Überlegung wurden verschiedene Tests basierend auf Einbau von radioaktiv-markierten Nukleotiden und PCR als Amplifizierungsschritt in den letzten Jahren entwickelt.

Ziel dieses Projektes ist es, die Telomeraseaktivität in Echtzeit und ohne Amplifizierungsschritt an festphasen-immobilisierten Oligonukleotiden zu messen.

Der erste Schritt besteht daher im Nachweis der Telomeraseaktivität mit hoher Sensitivität mittels Biosensortechnologie. Faseroptische Fluoreszenzsensoren können Oligomerhybridisierungen im submikromolaren Bereich durchführen. Ebenso kann die Polymeraseaktivität an Oberflächen direkt verfolgt werden dank der angesprochenen Evaneszenzfeldtechnologie. Die Zusammenführung dieser beiden Ergebnisse soll den Nachweis der Telomeraseaktivität ermöglichen. Dazu wird ein

Oligonukleotid auf der Oberfläche immobilisiert, das sowohl als Binder für die Telomerase sowie auch als Synthesestartpunkt für dessen Strangverlängerung fungieren soll.

Die Modifizierung der Oberfläche verläuft wie folgt. Im ersten Schritt wird die gläserne Oberfläche nach einer Standardmethode silanisiert. Das Oligonukleotide wird dann kovalent auf dieser Oberfläche immobilisiert. Bei Raumtemperatur injiziert man dann in den Pufferstrom den telomerasehaltigen Überstand von zentrifugierten, lysierten Zellen. Die Telomerase bindet an dem immobilisierten Oligonukleotid. Die Zugabe erfolgt bis die Oberfläche mit dem Enzym abgesättigt ist. Im Anschluß daran werden dem Enzymgemisch Nukleotide ,dNTP's, zu gleichen Teilen zugesetzt. Die Strangverlängerung wird initiiert, sichtbar durch den linearen Anstieg der Messkurve. Nach erfolgter Synthese wird nach dem Umschalten auf Laufpuffer die Dissoziation des Enzyms von der Oberfläche beobachtet.

Auf diese Weise ist es möglich, die Telomerase ohne Amplifizierungsschritt auf der Oberfläche zu detektieren.

### Funktionsweise der Telomerase

