

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Quantifizierung nativer mRNA

Björn Henze, Dr. Ursula Bilitewski, Dr. Joop van den Heuvel

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig

Tel. 0531 6181- 392 ; Fax. 0531 6181- 395

bhe@gbf.de www.gbf.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 169

Vortrag

Zur Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine, wie zum Beispiel von Wachstumsfaktoren, werden rekombinante Mikroorganismen, wie E.coli oder die Hefe Pichia Pastoris, eingesetzt. Ob die Effektivität der Transkription des eingefügten Gens, d.h. der Menge der gebildeten mRNA, oder andere Faktoren, zum Beispiel die Translation in Genprodukte, die Produktivität des Prozesses bestimmen, kann durch die quantitative Analyse der Genprodukte ermittelt werden. Daher nimmt auch bei der Entwicklung optimaler Produktionsstämme die mRNA-Bestimmung eine wichtige Rolle ein. Bisherige Methoden erlauben nur eine Abschätzung von mRNA-Konzentrationen und sind außerdem sehr zeitaufwändig, da sie auf der Trennung von mRNAs über Gelelektrophorese, ihrem Transfer auf Membranen durch Blotten und dem anschließenden spezifischen Nachweis durch Hybridisierung oft radioaktiv markierter Sonden, d.h. spezifischer Oligonukleotide, beruht. Neuere Methoden beruhen auf sogenannten DNA-Chips, bei denen Oligonukleotide auf einem Substrat, häufig auf Glaträgern, immobilisiert sind. Die mRNA wird durch reverse Transkription gegebenenfalls mit anschließender PCR in fluoreszierende Produkte umgesetzt, mit dem Chip inkubiert und anschließend die Fluoreszenz ausgewertet. mRNAs aus eukaryontischen Zellen, z.B. Hefen, besitzen an ihrem 3'-Ende einen sogenannten polyA-Schwanz, der der mRNA aus prokaryontischen Zellen (E. coli) fehlt. Damit ergibt sich bei der mRNA aus eukaryontischen Zellen die Möglichkeit, polyT-Oligonukleotide als generelle Erkennungssequenz einzusetzen. Ziel unserer Arbeiten ist es, Methoden zu etablieren, bei denen mRNAs aus eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen direkt, ohne weitere Modifizierungsreaktionen eingesetzt werden können. Dies sollte am Beispiel der mRNA des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) erfolgen.

Die Gewinnung nativer mRNA erfolgte zum einen mit einem Plasmid, bei dem stromabwärts eines T7-Promotors das zu untersuchende Gen (hbFGF) liegt und daran anschließend ein polyA-Schwanz. Mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase wurde so in vitro-mRNA (run-off-Transkripte) im µg-Maßstab hergestellt. Zum anderen wurde ein E.coli-Stamm, der das Gen exprimiert, kultiviert und die Gesamt-RNA extrahiert. Die Charakterisierung der Systeme erfolgte mit der in-vitro-mRNA, um den Einfluss unterschiedlicher Detektionsoligonukleotide zu untersuchen.

mRNAs existieren in einer Vielzahl von möglichen Sekundärstrukturen unterschiedlicher Stabilität, die die Zugänglichkeit von Oligonukleotiden für eine Hybridisierung erheblich erschweren können. Damit ist die Wahl der eingesetzten Oligonukleotide im Gegensatz zu den klassischen Methoden (Northern Blot), bei denen die Sekundärstrukturen durch Denaturieren aufgebrochen werden, extrem wichtig.

Die einfachste Möglichkeit, mRNA ohne weitere Modifizierungen nachweisen zu können, bieten direkte Affinitätssensoren. Deshalb wurde deren Eignung mit dem SPR-Gerät BIACORE 2000 überprüft. Verschiedene biotinylierte Oligonukleotide, die nach berechneten Strukturen der zu analysierenden mRNA [1] ausgewählt wurden, wurden auf Streptavidin-beschichteten Chips immobilisiert. Bei der Hybridisierung der eingesetzten Oligonukleotide mit dem Analyten wurden beträchtliche Unterschiede festgestellt. Am effektivsten hybridisierten die Oligonukleotide (oligoT), die mit dem polyA-Schwanz der mRNA wechselwirken, da dieser einzelsträngig vorliegt und mehrere Bindungsmöglichkeiten bietet. Die Oligonukleotide (Hyb1, Hyb2), die spezifische Sequenzen der mRNA erkennen, hybridisierten ca. 10fach weniger effektiv im Vergleich zu oligoT, wobei Hyb1 ca. 5fach höhere Signale als Hyb2 lieferte. Dieser Unterschied ließ sich jedoch durch Denaturieren durch Temperaturerhöhung (65°C für 10 min, dann auf Eis) verringern.

Im BIACORE ließ sich die mRNA des hbFGF (478 Basenpaare) spezifisch (Hyb1) ab ca. 20 µg / mL nachweisen.

Darüber hinaus wurde ein Mehrkanalfluoreszenzgerät für die mRNA-Detektion charakterisiert. Hier ist zwar die Notwendigkeit von zwei Sonden (eine zum Fangen auf dem Chip, eine für die Detektion) im Gegensatz zum BIACORE gegeben, die Sensitivität ist jedoch durch die Fluoreszenz-Markierung um das 1000fache höher [2].

Eine ähnlich sensitive Nachweismethode wie das Fluoreszenzgerät ist ein kolorimetrischer Assay in einer Mikrotiterplatte, dessen Sensitivität für mRNA im ng / mL - Bereich liegt

Der Nachweis von nativer mRNA beschränkt sich nicht auf den relativen Vergleich von Expressionsstärken, sondern gibt absolute Mengen an, die direkt mit Kultivierungsbedingungen korreliert werden sollen.

Literatur

[1] Zuker, M. (1989) *Science*, **244**, 48

[2] Schuderer, J., Akkoyun, A., Brandenburg, A., Wagner, E. (2000) *Anal. Chem.*, **17**, 3942

Frau Dr. Ursula Rinas und Frau Sabine Marten danken wir für die Hilfe bei der Kultivierung der E.coli-Stämme.