

Innovation in der RNA-Amplifikation: Eine neue Methode zur ursprungstretuen Amplifikation von geringen mRNA-Mengen

Peter Scheinert¹, Ludger Klein-Hitpass², Guido Krupp^{2*}

¹artus GmbH, Hamburg, ²Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen

Die großen Erfolge in den Genomprojekten und die Entwicklung der DNA-Chiptechnologie haben umfassende Genexpressionsanalysen ermöglicht, mit denen das komplexe Zusammenspiel tausender Genprodukte erfasst werden kann. In *Abbildung 1* ist beispielhaft ein Ausschnitt aus einem Microarray niedriger Dichte gezeigt.

Die für die DNA-Chiphybridisierungen notwendigen, großen RNA Mengen (mehrere µg Gesamt-RNA) limitieren diese Studien jedoch auf in größeren Mengen verfügbares Probenmaterial, wie z.B. aus Zellkulturen. Häufig stehen jedoch nur winzige Proben (wenige ng Gesamt-RNA) zur Verfügung, z. B. aus Biopsien oder aus einer geringen Anzahl definierter Zellen, die z.B. mittels Mikrodissektion isoliert wurden. Nur der Einsatz von mRNA Amplifikationsmethoden ermöglicht es, dieses limitierte Probenmaterial zu bearbeiten.

Die bereits üblichen Amplifikationstechnologien vermeiden in der Regel zyklische Verfahren wie PCR, denn dabei können sich zufällige, statistische Abweichungen unkontrollierbar aufschaukeln, was offensichtlich mit hochreproduzierbarer Amplifikation der komplexen zellulären mRNA-Mischungen interferiert. Stattdessen wird eine so genannte „lineare Amplifikation“ eingesetzt. Da mRNAs durch die 3'-Poly(A)-Sequenz) charakterisiert sind, kann sie selektiv mit einem Oligo(dT)-Primer aus Gesamt-RNA in cDNA revers transkribiert werden. Pro mRNA-Molekül wird daraus ein doppelsträngiges DNA-Template-Molekül gewonnen. Anschließend wird die komplexe Mischung von Template-Mo-

lekülen durch in vitro Transkription (meist mit der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7) vielfach transkribiert und dadurch amplifiziert. Somit können in einer einzigen derartigen Amplifikationsrunde bis zu Tausend Amplifikat-RNAs pro mRNA-Molekül erhalten werden. Oft reicht dies nicht aus, so dass die zunächst erhaltene, amplifizierte RNA in einer zweiten Amplifikationsrunde nochmals vermehrt wird. Die publizierten Verfahren basieren alle auf der gleichen Ursprungsstrategie^[1], und auch bei weiterentwickelten

Protokollen oder bei kommerziell verfügbaren Kits wurden beim zweiten Amplifikations-schritt gravierende Probleme beobachtet: (i) begrenzte Reproduzierbarkeit des schließlich im DNA-Chip erfassten Expressionsmusters, (ii) deutliche und darüber hinaus stark variable Verkürzung der Transkriptlängen, (iii) häufige Abweichungen in der quantitativen Repräsentation einzelner Gene führen zu

Verlusten in der Dynamik quantitativer Expressionsunterschiede sowie zu falschen Zuordnungen (differentielle Zunahme in der Expression statt Abnahme und umgekehrt), (iv) begrenzte Wiederfindungsrate von bereits unabhängig etablierten, differentiell exprimierten Genen und, (v) häufige Akkumulation von hochmolekularen Amplifikationsartefakten (mehrere Tausend Nukleotide lange RNAs), die auch in negativen Kontrollen in Abwesenheit von Ausgangs-RNA auftreten^[2].

Neue mRNA-Amplifikationstechnologie

Um diese Probleme der mRNA Amplifikation zu überwinden, wurde von artus eine neue Technologie, die „ExpressArt[®] mRNA Amplifikation“ entwickelt^[3]. Die Grundzüge der Technik sind in *Abbildung 2* dargestellt, sowie einige wesentliche Reaktionsschritte in *Abbildung 3*. Anders als in konventionellen Verfahren, wird bei der ersten cDNA-Synthese ein promotorfreier Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Anschließend wird die gesamte RNA (auch ribosomale RNAs, etc.) durch RNase-Behandlung entfernt. Durch ein spezielles Primer-Konstrukt „BOX-Random-TN“^[3] wird dann erreicht, dass das Priming bei der anschließenden Synthese von Doppelstrang-DNA stark bevorzugt nahe am 3'-Ende erfolgt. Erst dann wird mit dem T7-Promotor-Oligo(dT)-Primer der Promotor eingeführt, und somit

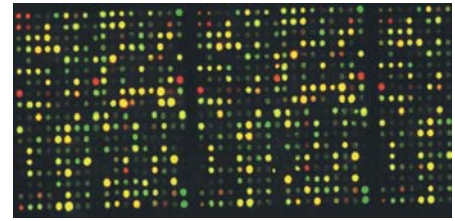


Abb. 1: Beispielhafter Ausschnitt aus einem Microarray. Zwei unterschiedliche RNA-Präparate wurden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert (Cy3 und Cy5) und mit einem Microarray hybridisiert. Gelb: Signale gleicher Intensität mit beiden RNAs; Rot: Erhöhtes Signal mit RNA-1; Grün: reduziertes Signal mit RNA-1. Schwarz: kein Signal mit beiden RNAs.

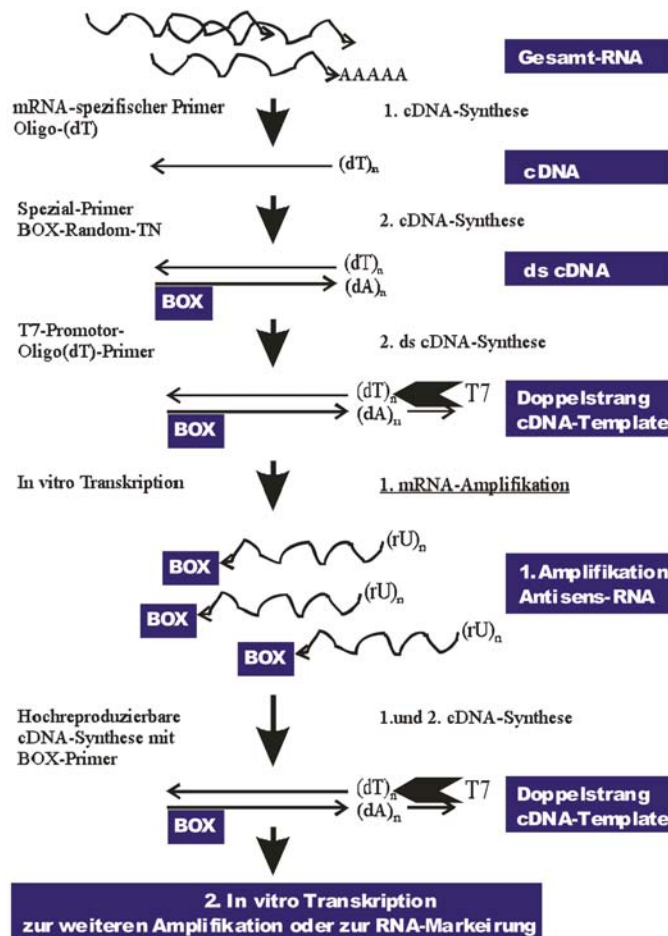


Abb. 2: Schema zur Reaktionsabfolge in der Amplifikationsmethode.

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt
65°C	4 Min.	1. cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primer
45°C	1 Min.	
Reaktionsmischung mit Reverser Transkriptase		
37°C	5 Min.	2. cDNA-Synthese mit "Box-Random-TN-Primer"
42°C	50 Min.	
45°C	10 Min.	
50°C	10 Min.	
70°C	15 Min.	
Ribonukleasen		
37°C	20 Min.	2. cDNA-Synthese mit "Box-Random-TN-Primer"
96°C	1 Min.	
37°C	1 Min.	Zugabe von DNA-Polymerase
37°C	30 Min.	
Enzymatische Primer-Entfernung		
37°C	5 Min.	Synthese des Doppelstrang-cDNA-Templates mit Oligo(dT)-T7-Primer
96°C	6 Min.	
96°C	1 Min.	Zugabe von DNA-Polymerase
37°C	1 Min.	
37°C	30 Min.	Zugabe von T4-DNA-Polymerase
37°C	3 Min.	
65°C	15 Min.	
Aufreinigung des Doppelstrang-cDNA-Templates		
37°C	14 h	1. Amplifikation durch in vitro Transkription mit T7 RNA-Polymerase
Aufreinigung der amplifizierten mRNA		

Abb. 3: Wesentliche experimentelle Reaktionsschritte

ein Doppelstrang cDNA-Tem-plate für die in vitro Transkription erhalten. Damit wird die erste mRNA-Amplifikation durchgeführt. Die Amplifikate sind Antisens-RNAs (komplementär zur ursprünglichen mRNA) und, wie beim konventionellen Verfahren, enthalten alle Moleküle am 5'-Ende eine Oligo-U-Sequenz. Alle *ExpressArt*[®] Amplifikate enthalten aber zusätzlich eine definierte Sequenz am 3'-Ende, die „BOX“ (eine 21-mer Se-

quenz mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme Kpn I und Hind III). Daraus resultiert die Besonderheit, dass ein einfaches, spezifisches und hochreproduzierbares Priming mit dem BOX-Oligo möglich wird. Das resultierende Doppelstrang cDNA-Tem-plate kann dann für eine ursprungstretue, zweite Amplifikationsrunde durch in vitro Transkription genutzt werden. Die Amplifikate der zweiten Runde sind struk-

turell identisch mit denen der ersten, so daß auch eine dritte Runde völlig problemlos möglich ist. Mit der *ExpressArt*[®] Technologie kommt es auch bei mehreren Amplifikationsrunden zu keiner variablen Längenverkürzung der amplifizierten RNA.

Die Effizienz der mRNA-Amplifikation wurde durch quantitative Real-Time RT-PCR mit dem LightCycler[®] überprüft. In *Abbildung 4* wurde mit äquivalenten Aliquots der Gesamt-RNA vor der Amplifikation (non amplified) bzw. der Amplifikat-RNA nach einer Amplifikationsrunde (amplified) jeweils eine cDNA mit Random Primern hergestellt, die dann mit genspezifischen Primern im LightCycler[®] durch PCR amplifiziert wurden. Ein Maß für die Kopienzahl in der untersuchten Probe ist dabei die Zahl der notwendigen PCR-Zyklen um eine minimale Schwellenwert zu überschreiten^[4]. Im gezeigten Beispiel ist der Wert vor der Amplifikation bei 37 Zyklen und nach Amplifikation um etwa 10 reduziert, und auf 27 Zyklen gesunken. Diese Differenz bedeutet eine 2¹⁰-fache Amplifikation, bzw. daraus resultiert der Faktor 1000 pro Amplifikationsrunde. Die speziellen Vorteile von *ExpressArt*[®] ermöglichen drei Amplifikationsrunden, die in einer mehr als 100-millionenfachen Amplifikation resultieren. Aus Ausgangsmaterial mit ca. 1 ng Gesamt-RNA (entspricht 0,02–0,05 ng mRNA) können so-

mit mehrere mg von mRNA-äquivalentem Amplifikat erhalten werden. Dies ermöglicht die Durchführung fast beliebig vieler, hochreproduzierbarer Microarray Hybridisierungen.

Ausblick

In ersten Versuchen^[5] mit High-density Microarrays (Affymetrix HG-U133A mit mehr als 20.000 Signalgruppen bzw. mehr als 400.000 Hybridisierungsarealen) wurde eine hochreproduzierbare Amplifikation nach zwei und nach drei Amplifikationsrunden festgestellt. In weiteren Analysen mit Vergleichen unterschiedlicher biologischer Proben, blieben quantitative Unterschiede differentiell exprimierter Gene (Zunahme, Abnahme, quantitative Unterschiede bis zu mehrhundertfachen Änderungen) auch nach zwei Amplifikationsrunden weitgehend erhalten.

Literatur

- [1] Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Bar-chas, J.D., Eberwine, J.H. (1990): Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1663–1667.
- [2] Baugh, L.R., Hill, A.A., Brown, E.L., Hunter, C.P. (2001): Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 29: E29.
- [3] Scheinert, P., Krupp, G. (2003): [Amplification of ribonucleic acids]. In *Patent DE 10,224,200 C1. artus GmbH, Germany.*
- [4] Krupp, G., Laue, T., Söller, R., Grewing, T., Cramer, S., Heß, M., Spengler, U. (2003): Nucleic acid preparations of pathogens from biological samples for real-time PCR analysis, pp. 95–135. In B. Bowien and P. Dürre (Eds.), *Nucleic Acids Isolation Methods. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch.*
- [5] Klein-Hitpass, L., Scheinert, P., Krupp, G., Manuskript in Vorbereitung.

Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. Guido Krupp
 artus GmbH
 Koenigstr. 4A
 D-22767 Hamburg
 Tel.: 040 41 364 783
 Fax: 040 41 364 710
 krupp@artus-biotech.com
 www.artus-biotech.com

Abb. 4: Quantitative Real-Time RT-PCR zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz. Etwa 1.000-fach pro Amplifikationsrunde.

