

Multiplexmethoden zur Profilierung der MikroRNA-Expression in biologischen Proben

Alastair W. Wark, Hye Jin Lee und Robert M. Corn*

Genexpression · Mikroarrays · MikroRNA ·
RNA-Profilierung · RNA-Stummschaltung

Die Entdeckung kleiner nichtcodierender RNA-Moleküle (MikroRNAs; miRNAs), die in der Lage sind, die Genexpression zu steuern, hat eine neue Komplexitätsebene bei der Regulation der Zellfunktionen aufgezeigt. Seit einigen Jahren wird nun versucht, die regulatorische Funktion von hunderten bis tausenden von miRNAs zu verstehen, die in pflanzlichen und tierischen Zellen exprimiert werden. Um hier entscheidend weiterzukommen, ist die Entwicklung quantitativer bioanalytischer Verfahren erforderlich, mit denen ein schneller, paralleler Nachweis aller miRNAs in einer bestimmten Zelle oder Gewebeprobe möglich ist. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir einige der neuesten Verfahren zur Hochdurchsatzprofilierung von miRNAs und schildern die besonderen technischen Herausforderungen, die dabei gemeistert werden müssen.

1. Einleitung

MikroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse kleiner, nichtcodierender RNA-Moleküle (etwa 19–23 Nucleotide lang), die in zahlreichen Pflanzen, Viren und Säugern nachgewiesen wurden. Sie werden zunächst im Zellkern als langkettige Vorstufen (pri-miRNA) transkribiert, die dann enzymatisch zu etwa 70 Nucleotide langen Ketten mit Haarnadelstruktur (pre-miRNA) abgebaut und in das Cytoplasma der Zelle exportiert werden. Dort erzeugt eine zweite enzymatische Prozessierung die etwa 22 Nucleotide langen, reifen miRNAs. Diese können nach Einbau in einen aktiven RNA-induzierten Stummschaltungskomplex (RISC) die Genexpression regulieren, indem sie mit komplementären Sequenzen von BotenRNAs (mRNAs) hybridisieren und dadurch die Translation hemmen und den Abbau der mRNA einleiten. Ein wichtiges Forschungsziel ist die Identifizierung der charakteristischen Haarnadelstruktur der pre-miRNA,^[1] darüber hinaus interessiert man sich aber vor allem für die Expressionshöhe der reifen miRNAs. Es gibt eine Reihe guter Übersichten über

den Mechanismus der Genregulation und Genstummschaltung durch miRNAs.^[2–6]

Obwohl die erste Beschreibung einer miRNA vor mehr als zehn Jahren erschien,^[7] beginnt man erst jetzt zu verstehen, welche Bedeutung miRNAs für die Genregulation und die Zellfunktion haben. Untersuchungen in Modellorganismen ergeben, dass miRNAs an der Regulation vieler zentraler biologischer Vorgänge wie Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Stoffwechsel und Immunantwort beteiligt sind.^[8–10] Vor kurzem haben mehrere Forschergruppen eine Verbindung zwischen der Expressionshöhe von miRNAs und der Tumorentstehung und -entwicklung beim Menschen aufgezeigt.^[11,12] Vergleichende Analysen zwischen bösartigen und normalen Gewebeproben ergaben charakteristische Muster, denen zu folge einige miRNAs in Abhängigkeit von Krebsart, Krankheitsstadium und Reaktion auf eine Behandlung überexprimiert und andere stark reprimiert sind.^[12] Es ließ sich auch zeigen, dass der Grad der miRNA-Expression die Tumorwachstumsgeschwindigkeit beeinflusst, woraus sich neue Therapiekonzepte ergeben könnten.^[13] Um die zelluläre Funktion von miRNAs im Detail untersuchen zu können, benötigt man eine Methode, um die Expressionsprofile reifer miRNAs in spezifischen Gewebetypen in unterschiedlichen Entwicklungs- oder Krankheitsstadien zu erfassen.

Aus diesem Grund wurden beträchtliche Anstrengungen zur Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden zur Multiplexanalyse der miRNA-Genexpression unternommen. Ge genwärtig sind über 4500 miRNA-Sequenzen in der miRNA-Datenbank erfasst,^[14,15] darunter 475 humane miRNAs. Die Gesamtzahl der miRNAs im menschlichen Genom ist noch nicht bekannt; Schätzungen anhand von Computeranalysen belaufen sich auf bis zu 1000.^[2,16] Vor kurzem veröffentlichten

[*] Dr. A. W. Wark, Dr. H. J. Lee, Prof. R. M. Corn
1102 Natural Sciences 2, Department of Chemistry
University of California, Irvine, CA 92697 (USA)
Fax: (+1) 949-824-8571
E-Mail: rcorn@uci.edu
Homepage: <http://www.corninfo.ps.uci.edu/>

Tuschl und Mitarbeiter eine der bislang umfassendsten Untersuchungen hierzu, wobei mithilfe experimenteller und bioinformatischer Verfahren miRNA-Expressionsprofile in 26 Organsystemen und Zelltypen von Menschen und Nagern analysiert wurden.^[17] Eine Übersicht über die bisherigen Fortschritte bei der Entdeckung und dem Nachweis von miRNAs ist in Abbildung 1 dargestellt. Die frühesten Ansätze einer systematischen Profilierung der miRNA-Expression beruhen auf der Anwendung von miRNA-Einzelnachweisen, z. B. durch Northern-Blotting.^[18] Paralleles Northern-Blotting ist eine arbeits- und materialaufwendige Technik, wird aber noch immer als Standardverfahren genutzt, um Daten, die mit neueren und empfindlicheren Techniken gewonnen wurden, zu validieren. Andere Multiplexverfahren für die miRNA-Einzelanalyse, darunter ein modifizierter Invader-Assay^[19] und die quantitative RT-PCR (Polymerasekettenreaktion nach Einwirkung reverser Transkriptase) von pri-miRNAs^[20] oder reifen miRNAs,^[21,22] sind sehr nachweisempfindlich und erfordern nur wenig Ausgangsmaterial. Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der RT-PCR war der gezielte Entwurf von RT-Primern mit hoher Spezifität für einzelne reife miRNAs.^[22] Prinzipiell wäre auch die Verwendung mehrerer Primer in einem Pool möglich, wodurch eine Hochdurchsatzprofilierung gelingen könnte, die den derzeitigen Einzelanalyseverfahren deutlich überlegen wäre.

Die Multiplexmethoden zum Einzelnachweis von miRNAs wurden in den letzten Jahren durch Oligonucleotid-Mikroarrays verdrängt, die gegenwärtig die effizienteste Strategie zur Hochdurchsatzprofilierung von miRNA darstellen.^[23-32] cDNA-Mikroarrays für den Multiplexnachweis von mRNAs haben sich als ausgesprochen wertvoll bei der Untersuchung der Genexpression in biologischen Proben erwiesen,^[33] und auf ähnliche Weise sollte es auch möglich sein,



Alastair W. Wark, geboren 1974 in Schottland, promovierte im Jahr 2000 in Chemie an der Universität Strathclyde bei Dr. Len Berlouis und Dr. Frank Cruikshank. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Lausanne ging er als Lindemann-Stipendiat an die Universität von Wisconsin in Madison, wo er mit Forschungen über oberflächenempfindliche spektroskopische Techniken begann. 2004 wechselte er mit der Arbeitsgruppe von Prof. Corn an die Universität von Kalifornien in Irvine.



Hye Jin Lee ist Forscherin am Fachbereich Chemie der Universität von Kalifornien in Irvine. Sie promovierte 1999 an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Lausanne bei Prof. Hubert H. Girault über die Entwicklung von mikrostrukturierten Flüssigflüssig-Grenzflächen und ihre Anwendung in der Ionenensorik. Ihre aktuellen Forschungen betreffen die Entwicklung oberflächenbasiert enzymatischer Amplifizierungsmethoden.



Robert M. Corn ist seit 2004 Professor in den Fachbereichen Chemie und Biomedizinische Technologie an der Universität von Kalifornien in Irvine. Er promovierte in physikalischer Chemie in Berkeley und schloss sich 1985 dem Fachbereich Chemie der Universität von Wisconsin an, wo er bis 2004 als Professor arbeitete. Seine Forschungen betreffen die Entwicklung und Anwendung oberflächenempfindlicher spektroskopischer Techniken wie Oberflächenplasmonenresonanz-Bildgebung, optische Frequenzverdopplung und Oberflächen-Schwingungsspektroskopie.

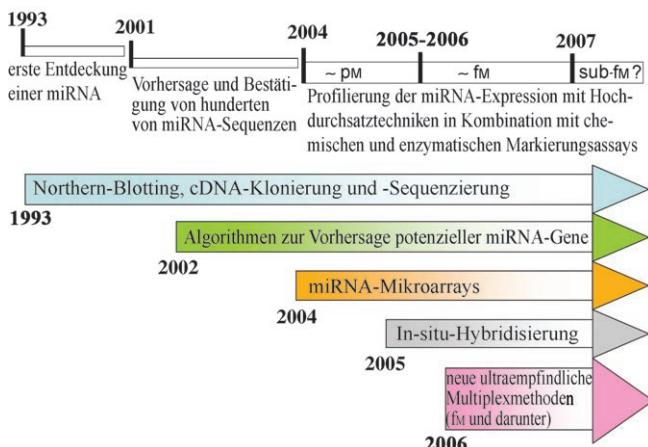


Abbildung 1. Übersicht über Entdeckung und Nachweis von miRNAs. Zu Beginn der Studien wurde die Northern-Blotting-Technik zur Expressionsanalyse eingesetzt, später wurden mithilfe von Klonierungs- und Sequenzierungsverfahren hunderte von miRNAs entdeckt. Ein zunehmend besseres Verständnis der Eigenschaften der miRNAs ermöglichte die Entwicklung von Computeralgorithmen, um nach potenziellen miRNA-Genen und miRNA-Targets zu suchen. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit der experimentellen Verfahren wurde über mehrere Generationen von Mikroarray-Strategien verbessert und optimiert. cDNA = komplementäre DNA.

Populationen von miRNAs mithilfe von DNA-Mikroarrays, die hunderte bis tausende komplementärer Sequenzen auf einer einzigen Chip-Oberfläche präsentieren, nachzuweisen und zu charakterisieren. Wegen der kurzen Sequenzlängen der miRNAs (19–23 Nucleotide) ist es allerdings nicht möglich, die zum Nachweis der mRNAs eingesetzten Oligonucleotid-Mikroarrays direkt zu nutzen. Auch die direkte PCR-Amplifikation reifer miRNAs gelingt nicht, was den ultraempfindlichen Nachweis von miRNAs in femtomolaren Konzentrationen zu einer besonderen Herausforderung macht. Im Folgenden stellen wir aktuelle Entwicklungen vor, um die derzeitigen Probleme beim Einsatz von Mikroarray-systemen zur Profilierung der miRNA-Expression in biologischen Proben zu überwinden.

2. Herausforderungen bei der miRNA-Profilierung

Mikroarraytechniken ermöglichen die simultane Analyse einer großen Zahl von miRNAs und sind deshalb besonders attraktiv für die Bestimmung der Expressionshöhen. Allerdings sind miRNAs deutlich schwieriger zu analysieren als

z.B. genomische DNA oder mRNA, da nur eine kurze Sequenz für die komplementäre Mikroarraysonde zur Verfügung steht. Die Schmelztemperaturen (T_m) der Doppelstränge sämtlicher bekannter miRNAs mit ihren komplementären DNA-Strängen variieren in einem weiten Bereich, und es ist nicht möglich, die Hybridisierungsausbeuten der Mikroarrayelemente zu normieren, indem man einfach die Länge einiger Sondensequenzen verringert. Die kurze Sequenz der miRNAs macht es auch schwierig, jedes Molekül verlässlich zu amplifizieren oder zu markieren, ohne das Signal zu beeinflussen. Hinzu kommt, dass miRNAs nur einen kleinen Anteil (ca. 0.01 %) der Masse einer RNA-Probe ausmachen und die relativen Expressionshöhen von miRNAs um etwa vier Größenordnungen schwanken (zwischen einigen wenigen Kopien und über 50000 Kopien pro Zelle).^[2] Außerdem muss sichergestellt werden, dass die inaktiven pri- und pre-miRNAs nicht zum Detektorsignal des Arrays beitragen.

Um die Genauigkeit der miRNA-Messungen zu verbessern, wurden hauptsächlich zwei Richtungen verfolgt: 1) Entwicklung neuer Strategien zum Entwurf der komplementären Sonden und 2) Entwicklung neuer Strategien zur Markierung der miRNAs. In den meisten miRNA-Studien wurden DNA-Fängersonden verwendet, wobei Bedingungen entstehen, die eher für einen Vergleich der Expressionshöhen gleicher miRNAs in unterschiedlichen Geweben geeignet sind, weniger aber für einen Vergleich der relativen Expressionshöhen unterschiedlicher miRNAs in der gleichen Probe. Um gleiche Hybridisierungsbedingungen zu erhalten, ohne dabei die Spezifität zu beeinträchtigen, wurden mehrere Ansätze vorgeschlagen, z.B. der Einbau modifizierter Nucleotide in die Sondensequenzen^[31,32] oder die Verlängerung des Doppelstrangs aus der Sondensequenz und der miRNA (gleichbedeutend mit einer Verstärkung der Wechselwirkung), indem mit der miRNA-Markierung zusätzliche Basenpaare eingeführt werden.^[34] Castoldi et al.^[31] beschrieben vor kurzem die Verwendung „fixierter“ Nucleinsäuren (locked nucleic acids; LNAs) anstelle von konventionellen DNA-Sonden. LNAs sind kommerziell erhältliche Nucleinsäureanaloga, die ein oder mehrere modifizierte Nucleotidmonomere enthalten, in denen der Riboserest durch eine zusätzliche Brücke zwischen dem 2'-O und dem 4'-C modifiziert ist. Über die Anzahl und Position der modifizierten Nucleotide kann die Thermostabilität der einzelnen miRNA-LNA-Doppelstränge gezielt eingestellt werden, sodass ein vollständiger Satz von T_m -normalisierten Sonden erhältlich ist, der ein genaueres Expressionsprofil ermöglicht. Die höhere Bindungsaaffinität der LNA-Sonden führt nicht nur zu einer zehnfach besseren Nachweisempfindlichkeit als mit den unmodifizierten DNA-Sonden, sondern auch zu einer besseren Differenzierung zwischen eng verwandten miRNAs.^[31,35]

Eine andere Herausforderung in der Expressionsanalyse von miRNAs liegt darin, dass die üblichen Methoden zur Amplifizierung und Markierung längerer RNA- und DNA-Zielstrukturen nicht direkt angewendet werden können. Um ein exaktes miRNA-Profil zu erhalten, ist es äußerst wichtig, dass die Markierungsmethode die Mengenverhältnisse der miRNAs in der Probe unverändert lässt, und dass dabei die biologische Integrität und die Hybridisierungsausbeute der

Ziel-miRNA erhalten bleiben. Die Spezifität des Markierungsverfahrens für reife miRNA kann mithilfe kommerziell erhältlicher miRNA-Anreicherungskits (z.B. von Ambion oder Qiagen) verbessert werden, die die pri-miRNAs und andere größere RNA-Moleküle entfernen. In den folgenden Abschnitten stellen wir einige chemische und enzymatische Methoden vor, die zur direkten Anbringung von Markern entwickelt wurden und empfindliche Nachweise ermöglichen. Eine Zusammenfassung findet sich in Tabelle 1. Zum Vergleich mit anderen Markierungsverfahren sind auch Beispiele für Nachweismethoden aufgeführt, bei denen die miRNA vor der Hybridisierung nicht modifiziert wird.

3. Direkter Nachweis von miRNAs

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten existieren einige direkte Multiplexmethoden zur miRNA-Analyse, die hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit der Northern-Blot-Technik nahekommen oder diese sogar übertreffen. „Direkt“ heißt, dass die miRNA ohne vorherige chemische oder enzymatische Modifikation des Zielmoleküls nachgewiesen wird. Ein ebenfalls intensiv bearbeitetes, nichtparalleles direktes Nachweisverfahren, das hier aber nicht behandelt wird, ist die In-situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten komplementären LNA-Sonden, die eingesetzt werden kann, um die spezifische Lokalisation und Evolution einer reifen miRNA in verschiedenen Organismen und Geweberegionen sichtbar zu machen.^[36-38]

Eine Reihe direkter Nachweismethoden für die Profilierung von miRNAs wurde entwickelt (Tabelle 1). Im Folgenden beschreiben wir zwei Beispiele für einen direkten parallelen miRNA-Nachweis: 1) ein Sandwichassay-Format in Lösung, bei dem die Ziel-miRNA gleichzeitig mit einem Paar spektral unterscheidbar fluoreszenzmarkierter Oligonucleotidsonden hybridisiert wird, die jeweils zu einer Hälfte der Ziel-miRNA komplementär sind, und 2) ein Festphasenassay, der direkt die sequenzspezifische Adsorption (als „Hybridisierungsadsorption“ bezeichnet) an komplementäre Elemente eines Sondenarrays auf einem dünnen Goldfilm erfasst.

3.1 Direkte Multiplexdetektion von miRNAs in flüssiger Phase

Ein Zweisonden-Hybridisierungsverfahren, mit dem sich einzelne miRNA-Moleküle direkt in Lösung nachweisen lassen, wurde kürzlich von Neely et al. vorgestellt.^[39] Die beiden Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzgruppen markiert und binden spezifisch je an eine Hälfte der Ziel-miRNA (Abbildung 2). Die Messung ist nur möglich, weil die LNA-Sonden die miRNA mit höherer Affinität als konventionelle DNA binden und man so mit einer Sondenlänge von zehn Nucleotiden auskommt. Nach der Hybridisierung wird die Probenlösung durch eine Mikrofluidikkapillare gepumpt, in der mehrere Laser die fluoreszierenden Sonden, die durch ein sehr kleines Volumen passieren, bei unterschiedlichen Wellenlängen anregen. Einzelne miRNA-Moleküle lassen sich leicht an der gleichzeitigen starken Emission von Pho-

Tabelle 1: Zusammenstellung von Methoden zur Profilierung der miRNA-Expression.

	Methode	Anmerkungen	Lit.
Direkter Nachweis	Northern-Blotting	Hybridisierung komplementärer ^{32}P - oder Digoxigenin-markierter Oligonucleotidsonden nach gelelektrophoretischer Trennung.	[18, 35, 52]
	Einzelmolekülfloreszenz	Doppelte Hybridisierung von zwei fluoreszenzmarkierten LNA-Sonden in einem Sandwich-Format.	[39]
	Signalverstärkende Ribozyme	Hybridisierung von miRNA an ein Ribozym oder einen molekularen „Köder“ induziert die Trennung von Fluorophor und Fluoreszenzlöscher und verstärkt so das Signal.	[53]
	In-situ-Hybridisierung	In-situ-Analyse von Geweben und Zellen: Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten komplementären Sonden, die chemisch modifizierte Nucleotide (z. B. LNAs) enthalten.	[36–38]
Chemische Modifikation in flüssiger Phase	Fluoreszenz-Bildgebung	Koordination des Pt-Fluorophor-Komplexes an Guaninreste (Alexa Fluor); Alkylierung von N-Heteroatomen an beliebigen Nucleotidbasen (Label IT); 3'-Markierung: 1) NaIO_4 und 2) Bildung eines Aminderivats, das dann mit NHS-Cy5 reagiert;	[23]
		3'-Markierung: 1) NaIO_4 , 2) Biotin-Hydrazid und 3) Bindung von Streptavidin-Quantenpunkt-Konjugaten an hybridisierte miRNA.	[43]
	Elektrochemische Methoden	3'-Markierung: 1) NaIO_4 und 2) Isoniazid-konjugierte OsO_4 -Nanopartikel.	[32]
Enzymatische Modifikation in flüssiger Phase	Klonierung	cDNA-Klonierung und -Sequenzierung in großem Maßstab.	[45]
	Fluoreszenz-Bildgebung	T4-RNA-Ligasereaktion, die markierte Nucleotide direkt kovalent an das 3'-Ende der miRNA anheftet;	[24, 31, 34, 55]
		1) Poly(A)-Polymerasereaktion, die einen 3'-Schwanz synthetisiert, der ammino-modifizierte Nucleotide enthält; dieser reagiert 2) mit der NHS-Estergruppe eines Farbstoffs (Markierungskit mirVana);	[47]
		1) Verlängerung durch Poly(A)-Polymerase, 2) T4-DNA-Ligation der Marker-DNA und 3) Hybridisierung eines markierten DNA-Dendrimers (Markierungskit Ncode);	[29, 48]
		1) T4-RNA-Ligation von 3'- und 5'-Adapteroligonucleotiden und 2) RT-PCR mit Einbau von Markierungen.	[27, 28, 30]
	Invader-Assay	Bindung von zwei überlappenden Haarnadelsonden an miRNA, dadurch Bildung einer Stelle, die für eine Spaltung und anschließende fluorimetrische Analyse erkannt wird.	[19]
	Quantitative RT-PCR	Diverse Strategien zur Erzeugung von Primern, die individuelle pri-miRNAs oder reife miRNAs erkennen.	[20–22]
Oberflächengekoppelte enzymatische Modifikation	Rolling-Circle-Amplifikation	miRNA-Nachweis mit blockierenden Sonden und enzymatischer Amplifikation.	[56]
	Cytometrie mit fluoreszenzmarkierten Kugelchen	1) Ligation von 3'- und 5'-Adapteroligonucleotiden an miRNA, 2) RT-PCR mit biotinmarkiertem Primer und 3) Detektion der Kugelchen.	[27, 57]
	SPR-Imaging	1) Durch Poly(A)-Polymerase katalysierte 3'-Verlängerung hybridisierter/adsorbiert miRNA und 2) komplementäre Hybridisierung von Poly(T)-beschichteten Goldnanopartikeln.	[49]
	RAKE-Assay (Fluoreszenz-Bildgebung)	1) Durch das Klenow-Enzym katalysierte Verlängerung hybridisierter/adsorbiert miRNA mit biotinkonjugierten Nucleotiden und 2) Nachweis durch Bindung von Streptavidin-Farbstoff-Konjugaten.	[50, 51]

tonen unterschiedlicher Wellenlängen von den beiden anhybridisierten Fluorophorgruppen der Sonden erkennen. Die Zahl der miRNA-Moleküle, die innerhalb eines bestimmten Zeitraums detektiert werden, dient als Maß für die Konzentration in der Probe. Veranschaulicht wurde dies anhand der Expressionshöhe von 45 humanen miRNAs in 16 verschiedenen Geweben mit einer Nachweisgrenze von 500 fm. Dabei wurde durch die LNA-Sonden auch eine hohe Spezifität gewährleistet, die miRNAs, die sich nur durch ein einziges Nucleotid unterscheiden, eindeutig voneinander abgrenzte. In jedem Probevolumen wird zwar nur eine einzelne miRNA-Sorte nachgewiesen, doch genügen bereits 50 bis 100 ng Ge-

samt-RNA, um einen Messpunkt zu bestimmen. Dies liegt um eine Zehnerpotenz niedriger als bei Standard-Mikroarray-methoden, bei denen meist noch zusätzliche präparative Markierungs- und Amplifikationsschritte erforderlich sind.

3.2. Direkte Multiplexdetektion von miRNA im Festphasen-Assay

Kurze, unmarkierte RNA- und DNA-Oligonucleotide lassen sich in einem Mikroarrayformat mithilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Bildgebung (SPRI) nachweisen und identifizieren. Diese oberflächensensitive optische Technik

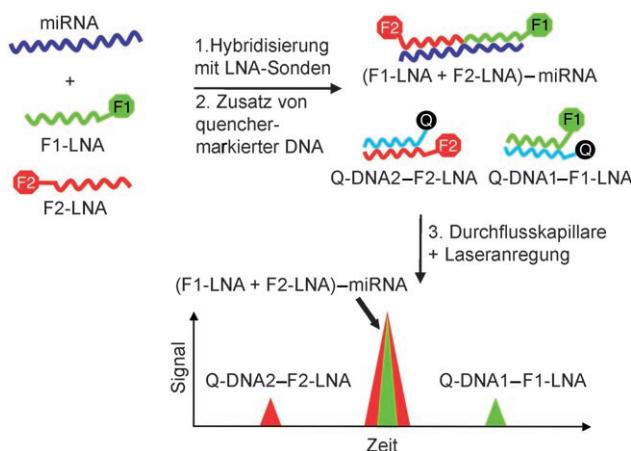


Abbildung 2. Direkter Nachweis von miRNA-Einzelmolekülen:
Schritt 1: Zwei spektral unterschiedlich fluoreszierende LNA-Sonden (F1-LNA und F2-LNA) werden in Lösung an jede Ziel-miRNA in einem Sandwichassay-Format hybridisiert, sodass markierte F1-LNA- und F2-LNA-miRNA-Doppelstränge entstehen. Schritt 2: Komplementäre, mit einem Fluoreszenzlöscher modifizierte DNA-Sonden (Q-DNA1 und Q-DNA2) werden zugegeben. Diese hybridisieren mit den verbliebenen „freien“ LNA-Sonden und bilden zwei unterschiedliche Doppelstränge (Q-DNA1-F1-LNA und Q-DNA2-F2-LNA). Schritt 3: Die Probenlösung wird durch eine Mikrofluidikkapillare gepumpt und mit Laserlicht entsprechend der Anregungswellenlänge von F1 und F2 bestrahlt. Ein Signal, das die Ziel-miRNA anzeigt, wird in Form von zwei gleichzeitig auftretenden Peaks beobachtet, wenn die beiden Sonden F1 und F2 gleichzeitig angeregt werden. Wiedergabe in veränderter Form nach Lit. [39].

wurde schon vielfach für die Echtzeitverfolgung biologischer Affinitätswechselwirkungen (z. B. DNA–DNA, RNA–DNA oder Peptid–Protein) an Biopolymerschichten auf einem dünnen Goldfilm eingesetzt.^[40] Die Nachweisgrenze der SPRI für DNA und RNA liegt im niedrigen nanomolaren Bereich^[41,42] und ist damit höher als bei Fluoreszenz-Mikroarraymessungen; sie liefert allerdings wertvolle Einblicke in die kinetischen und thermodynamischen Randbedingungen der miRNA-Hybridisierungsadsorption an Oberflächen.

Ein Beispiel für den Nachweis von RNA durch Hybridisierungsadsorption auf DNA-Mikroarrays mit SPRI ist in Abbildung 3 gezeigt. Ein Zweikomponenten-Mikroarray mit einzelsträngiger DNA (ssDNA) wird so mit der Ziel-RNA inkubiert, dass nur exakt passende Array-Elemente Doppelstränge mit der RNA durch Hybridisierung bilden (siehe Einschub in Abbildung 3b). Als Folge der selektiven Hybridisierungsadsorption wird eine Zunahme der Reflektivität, gemessen in Prozent ($\Delta\%R$), beobachtet. Liegt der Anstieg des SPRI-Signals unter 10 %, ist er direkt proportional zur relativen Oberflächenbedeckung (θ) durch die komplementäre RNA. Die Bindungsaffinität zwischen RNA und der oberflächengebundenen DNA-Sonde kann errechnet werden, indem man die Langmuir-Isotherme aufträgt (Abbildung 3b). Die Größe θ ist mit der Konzentration der Gesamt-RNA (C_{RNA}) gemäß der Langmuir-Adsorptionsisotherme nach Gleichung (1) verknüpft (K_{ads} ist der Langmuir-Adsorptionskoeffizient).

$$\theta = K_{\text{ads}} C_{\text{RNA}} / (1 + K_{\text{ads}} C_{\text{RNA}}) \quad (1)$$

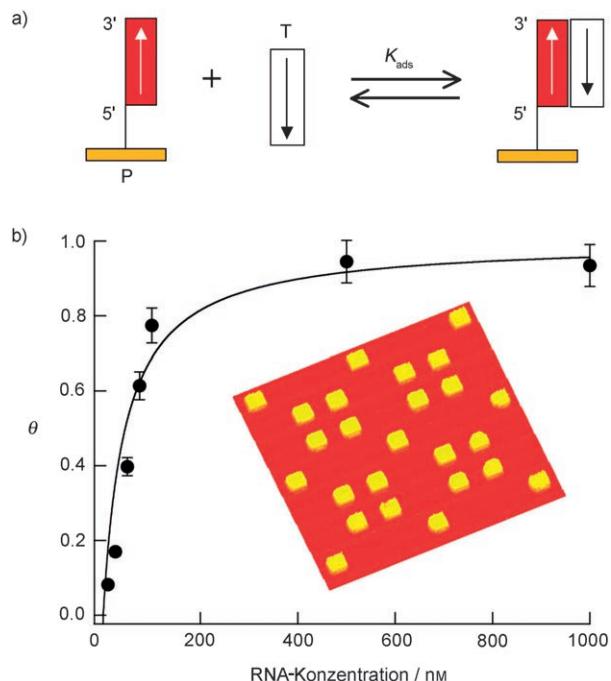


Abbildung 3. a) Prinzip der Hybridisierungsadsorption eines einzelsträngigen RNA-Zielmoleküls (T) an eine einzelsträngige DNA-Sonde (P) auf einem Mikroarray. b) Beispiel für die relative Oberflächenbedeckung als Funktion der Konzentration der Ziel-RNA. Die durchgezogene Linie ist eine an die Daten angepasste Langmuir-Isotherme, aus der ein Wert von $K_{\text{ads}} = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ bestimmt wurde. Der Einschub zeigt ein SPRI-Differenzbild, das durch die Subtraktion der Aufnahmen vor und nach der sequenzspezifischen RNA-Hybridisierungsadsorption an einem Zweikomponenten-DNA-Mikroarray gewonnen wurde.

Bei einer RNA-Hybridisierungsadsorption auf einem DNA-Mikroarray liegt K_{ads} bei etwa 10^7 M^{-1} . Dieser Wert kann etwa um den Faktor zehn vergrößert werden, wenn man die ssDNA-Sonden durch LNAs ersetzt, die die RNA mit höherer Affinität binden. Dies verbessert Nachweisempfindlichkeit und Spezifität der Oberflächenhybridisierungsmeßung.^[31]

Aus den SPRI-Daten in Abbildung 3 sieht man, dass bei biologisch relevanten Konzentrationen (pm und niedriger) der Anteil der Oberflächenbedeckung durch miRNA im Gleichgewicht auf jedem Mikroarrayelement extrem niedrig ist. Nimmt man beispielsweise ein K_{ads} von etwa 10^8 M^{-1} und eine gesamte miRNA-Konzentration von 10 fm an, liegt die Gleichgewichtsoberflächenbedeckung durch miRNA bei nur 10^{-6} . Eine gute Schätzung der Oberflächendichte von LNA-Sonden auf einem Mikroarrayelement liegt bei etwa $1 \times 10^{12} \text{ Molekülen cm}^{-2}$, sodass die Oberflächendichte von LNA-miRNA-Doppelsträngen bei $10 \text{ fm} \cdot 10^6 \text{ Moleküle cm}^{-2}$ beträgt. Bei einem 500-μm-Arrayelement, wie es für SPRI üblich ist, entspricht dies 2500 miRNA-Molekülen; auf einem 50-μm-Arrayelement, wie es typischerweise in der Fluoreszenz-Bildgebung eingesetzt wird, finden sich auf dieser Oberfläche gerade einmal 25 miRNA-Moleküle! Dies zeigt eindrucksvoll, wie schwierig es ist, sehr niedrige RNA-Konzentrationen nachzuweisen und wie wichtig Sondensequenzen sind, die eine hohe Bindungsaffinität zu ihren Ziel-miRNAs haben.

Ein zweiter Grund, weshalb die Bestimmung niedriger miRNA-Konzentrationen mit Mikroarrays schwierig ist, hängt mit der Kinetik der Hybridisierungsadsorption zusammen. Die Geschwindigkeitskonstante k_a für die Adsorption von miRNA beträgt etwa $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, und die Geschwindigkeit der Adsorptionsreaktion lässt sich mit $k_a C_{\text{RNA}}$ beschreiben. Demnach wird deutlich mehr Zeit benötigt, bis eine Gleichgewichtsoberflächenbedeckung erreicht ist, wenn die Konzentration sinkt. Außerdem spielt die Diffusion eine Rolle, denn bei niedrigen Konzentrationen nimmt die Zeit zu, die die miRNA-Moleküle benötigen, um die Oberfläche der Arrayelemente zu erreichen. Bei 10 fm benötigt man eine Reaktionszeit von mindestens 4 Stunden, um die Gleichgewichtsbeladung zu erreichen, und dies auch nur dann, wenn in einer Durchflusszelle gearbeitet wird, um die Diffusionseffekte zu minimieren. Bei noch niedrigeren Konzentrationen und ohne Durchflusszelle werden noch längere Reaktionszeiten erforderlich.

Sowohl die Lage des Langmuir-Adsorptionsgleichgewichts als auch die Adsorptionskinetik zeigen deutlich, dass bei Anwendung von Mikroarraytechniken zur Profilierung von miRNAs Amplifikationsverfahren notwendig sind. Mehrere chemische und enzymatische Verfahren zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von Fluoreszenz- und SPRI-Mikroarraymessungen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

4. Strategien für eine chemische Modifikation zum Multiplex-miRNA-Nachweis

Um in einem miRNA-Assay höhere Nachweisempfindlichkeiten zu erreichen, müssen die Zielmoleküle vor der Nachweisreaktion chemisch oder enzymatisch modifiziert werden. Die bislang verfolgten Strategien zur chemischen Modifizierung sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die einfachste Möglichkeit ist, eine fluoreszierende Gruppe direkt an den miRNA-Molekülen anzubringen. In Abbildung 4 sind beispielhaft drei Strategien dargestellt, die in letzter Zeit für den fluoreszenzgestützten Nachweis von miRNAs durch chemische Markierung genutzt wurden.

Babak et al. beschrieben einen Platin-Farbstoff-Komplex, der ein stabiles Addukt an der N⁷-Position einer beliebigen Guaninbase der miRNA bilden kann (Abbildung 4a).^[23] Das Cisplatin-Derivat (Ulysis Alexa Fluor, Molecular Probes) ist kovalent an einen Fluorophor gebunden, der nur eine reaktive Koordinationsstelle verfügbar hat. Inkubiert man die Verbindung in Lösung bei erhöhter Temperatur mit miRNAs, findet eine Ligandenaustauschreaktion statt, in deren Verlauf ein labiles Nitrat an der reaktiven Stelle durch eine koordinative Bindung ersetzt wird, die den Fluorophor fest an die miRNA kuppelt. Dieser Ansatz setzt voraus, dass die verwendeten miRNAs zumindest einen G-Rest aufweisen.

Ein zweiter Ansatz, der ebenfalls auf einzelne Basen in der miRNA-Sequenz abzielt, ist in Abbildung 4b dargestellt. In diesem Fall alkyliert eine aromatische Chlorethylaminogruppe, die an einen Fluorophor gekuppelt ist (Label IT, Mirus Bio) direkt jedes reaktive N-Heteroatom in der miRNA mit einer gewissen Präferenz für N⁷ von Guanin, N³ von

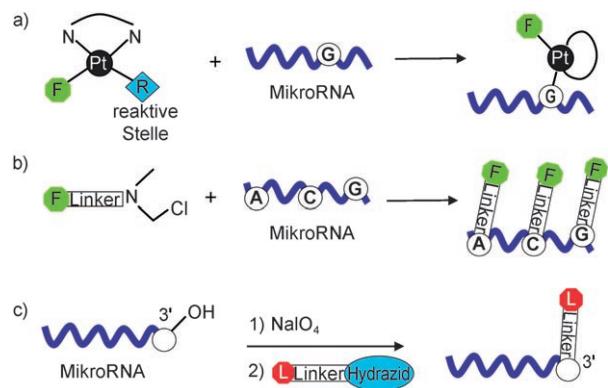


Abbildung 4. Strategien zur chemischen Markierung von miRNAs:

a) Bildung einer koordinativen Bindung zu einem Platin-Fluorophor-Komplex (Reagens: Ulysis Alexa Fluor) durch Reaktion mit der N⁷-Position einer beliebigen Guaninbase (G). b) Eine Alkylierungsreaktion (Reagens: Label IT), die jedes reaktive N-Heteroatom der miRNA modifizieren kann; eine gewissen Präferenz besteht für die Basen Guanin (G), Cytosin (C) und Adenin (A). c) Eine zweistufige Endmarkierungsreaktion, in der das 2',3'-Diol des Ribosering am 3'-Ende der miRNA zunächst mit Natriumperiodat zum Dialdehyd oxidiert und anschließend mit einem Hydrazid, das an eine Markierungsgruppe gebunden ist, kondensiert wird.

Adenin und N³ von Cytosin.^[43] Weil diese Markierungsreaktion auf der Modifikation von Nucleotidbasen beruht, muss überschüssiges Reagens sehr sorgfältig entfernt werden, um die Markierung der Oligonucleotidsäure auf der Mikroarray-Oberfläche zu vermeiden; dies würde zu falsch-positiven Messergebnissen führen. Der größte Nachteil beider Strategien der Nucleotidmodifizierung besteht in der mangelnden Spezifität für miRNA gegenüber anderer RNA oder DNA in der Probe. Eine gewisse Spezifität für kleine RNA-Moleküle kann durch eine Größenfraktionierung vor der Markierung erreicht werden, sodass man eine Probe erhält, in der miRNA angereichert ist. Außerdem besteht die Gefahr, dass die Bindungssaffinität zwischen modifizierter miRNA und den Oligonucleotidsäure beeinträchtigt wird.

Ein dritter Ansatz, der eine bessere Kontrolle über die Anzahl der Markierungen pro miRNA-Molekül ermöglicht und der ursprünglich von Weiler et al.^[32,44] für die Markierung von mRNA entwickelt wurde, ist in Abbildung 4c dargestellt. Bei dieser Methode wird zunächst das 2',3'-Diol am Ribosering am 3'-Terminus der miRNA mit Natriumperiodat zum Dialdehyd oxidiert. Durch Kondensation mit einem Hydrazin lässt sich dann eine einzelne Markierungsgruppe kovalent an das 3'-Ende jeder miRNA kuppeln. Da diese Reaktion ein intaktes 2',3'-Diol benötigt, wird mögliches Untergrundrauschen durch 3'-Phosphatgruppen tragende RNA-Verunreinigungen oder durch DNA minimiert. Außer zur Markierung mit Farbstoffen^[32] wurde diese Reaktion auch zur Biotinylierung von miRNA-Proben für die Mikroarrayanalyse verwendet.^[45] Die hybridisierte miRNA wurde dann fluorimetrisch mit Streptavidin-Quantenpunkt-Konjugaten, die über Biotin an die miRNA gebunden waren, nachgewiesen. Die aufgeführte Nachweisgrenze von etwa 40 pm (0.4 fmol) war ähnlich wie bei einer vergleichbaren Methode derselben Autoren, die auf einer colorimetrischen Messung mit Strep-

tavidin-modifizierten Gold-Nanopartikeln beruhte.^[45] Ein weiteres Beispiel für diese Methode der chemischen Markierung ist die direkte Kupplung von OsO₂-Nanopartikeln an miRNAs, die an eine modifizierte Elektrodenoberfläche hybridisiert wurden.^[46] Obgleich die Messungen auf eine einzelne miRNA pro Elektrode beschränkt sind, ermöglicht die amperometrische Bestimmung mittels elektrokatalytischer OsO₂-Oxidation von Hydrazin den Nachweis von nur 80 fm der miRNA.

5. Strategien zur enzymatischen Modifikation in Lösung

Die erfolgreichsten Strategien zur miRNA-Modifizierung für den Multiplex-miRNA-Nachweis beruhen auf enzymatischen Reaktionen entweder in Lösung oder direkt auf der Mikroarrayoberfläche. Nucleinsäuremodifizierende Enzyme werden oft in biotechnologischen Anwendungen als hoch effiziente Werkzeuge zur Amplifikation und ortsspezifischen Manipulation von genomischer DNA und RNA eingesetzt. Eine der häufigsten Enzymreaktionen zur miRNA-Modifikation ist die Verlängerung der Ziel-miRNA durch katalytische Kupplung von Nucleotiden an das 3'- oder das 5'-Ende. Diese Verlängerungsreaktionen ermöglichen es, konventionelle Methoden wie Klonieren und PCR-Amplifikation zur Entdeckung und zum Nachweis von miRNAs einzusetzen.

Es gibt mehrere enzymatische Methoden in Lösung, die für die Hochdurchsatzprofilierung von miRNAs mit Mikroarrays vorgeschlagen wurden. Ein schon mehrmals beschriebener Ansatz beruht auf der Ligation von Oligonucleotidsequenzen an die 3'- und 5'-Enden der miRNA und dem anschließenden Aufbau einer cDNA-Bibliothek durch Einwirkung von reverser Transkriptase. Die Bibliothek wird dann mit PCR amplifiziert, wobei fluoreszierende Markierungen eingebaut werden, und per Mikroarray analysiert.^[27,28,30] Dieser indirekte Ansatz zur miRNA-Profilierung ist zwar sehr empfindlich, erfordert aber eine langwierige Probenvorbereitung. Wir beschreiben hier drei bequemere enzymatische Reaktionen, mit denen eine oder mehrere Markierungen in Lösung direkt an jeder Ziel-miRNA angebracht werden können.

Eine der effizientesten enzymatischen Modifikationen für die miRNA-Analyse beruht auf dem Einsatz der T4-RNA-Ligase, mit der das 5'-Ende einer Polynucleotidsequenz jeder gewünschten Länge an das 3'-OH-Ende der miRNA gekuppelt werden kann. Diese Reaktion wurde erstmals von Thomson et al. genutzt,^[24] um einen miRNA-Pool mit einem fluorophorkonjugierten Dinucleotid zu modifizieren (Abbildung 5a). Das Dinucleotid blockiert das 3'-Ende, sodass sichergestellt wird, dass nur eine Markierungsgruppe an jedes miRNA-Molekül gebunden wird. Die Reaktionsbedingungen wurden von Wang et al. weiter optimiert,^[34] um die Störungen durch variierende miRNA-Sequenzen und Sekundärstrukturen, die sich nachteilig auf die Ligationsausbeute auswirken, zu minimieren. Zudem wurde postuliert, dass durch eine verbesserte Strategie zur Synthese der DNA-Sonden eine Nachweisgrenze von etwa 5 fm (0.2 amol in 45 µL) erreicht werden könnte.

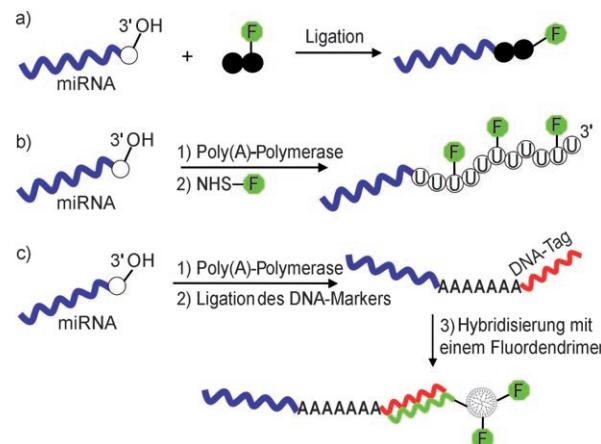


Abbildung 5. Enzymatische Strategien zur miRNA-Markierung. a) Ligation eines fluorophorkonjugierten Dinucleotids an das 3'-OH-Ende einer miRNA mithilfe der T4-RNA-Ligase. b) Verwendung von Poly(A)-Polymerase aus *E. coli* als Katalysator zur Nucleotidaddition, wobei am 3'-Ende jeder miRNA eine Poly(U)-Sequenz entsteht. Einige der zugegebenen Nucleotide sind aminomodifiziert und werden anschließend kovalent mit einem Fluorophor gekuppelt, das als reaktive Gruppe einen N-Hydroxysuccinimidester trägt. c) Enzymkatalysierte Bildung einer 3'-Poly(A)-Kette mit anschließender enzymatischer Ligation einer DNA-Markierungssequenz an das 3'-Ende des Poly(U). Die so markierte miRNA wird an einen Mikroarray hybridisiert und dann mit einem DNA-modifizierten Dendrimer nachgewiesen, das komplementär zur Markierungssequenz ist und mehrere hundert Fluorophore für eine empfindlichere Detektion trägt.

Eine weitere Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit wurde mit kombinierten Verlängerungs-/Markierungsverfahren erzielt, die die Anbindung mehrerer Markierungsgruppen ermöglichen (siehe Abbildungen 5b und c). Das Markierungskit mirVana von Ambion (Abbildung 5b) ermöglicht die Anbindung eines 20- bis 50-gliedrigen Polynucleotids an jede miRNA unter Verwendung von Poly(A)-Polymerase. Diese erzeugt am 3'-Ende eine gemischte Sequenz aus Standard- und aminomodifizierten Basen.^[47] Die aminomodifizierten miRNAs werden dann kovalent mit einem Farbstoff versehen. So entsteht eine mehrfach markierte miRNA-Probe, die auf den Mikroarray überführt und mit Fluoreszenz-Bildgebung nachgewiesen wird. Das enzymatische NCode-Verfahren von Invitrogen (Abbildung 5c) verläuft ebenfalls über die Bildung eines 3'-Poly(A)-Endes. Mit einer zweiten enzymatischen Reaktion mit T4-DNA-Ligase wird dann eine eindeutige Oligonucleotid-Tag-Sequenz kovalent mit dem 3'-Ende der Poly(A)-Kette verknüpft. Nach einem Reinigungsschritt wird die RNA-Probe auf den Mikroarray aufgebracht, wo jede markierte miRNA durch Hybridisierung an ein für eine einzelne Sequenz spezifisches Dendrimer nachgewiesen wird. Das Dendrimer enthält etwa 900 Fluorophore und verstärkt das Nachweissignal drastisch. Kürzlich wurde dieses Verfahren noch weiter verfeinert: Durch die Kombination von reverser Transkriptase mit einem Poly(dT)-Primer und T7-Polymerase werden alle miRNA-Moleküle etwa gleich amplifiziert, bevor die Markierung mit dem Dendrimer erfolgt. Dadurch wird eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit erreicht.^[48]

6. Strategien zur festphasenbasierten enzymatischen Modifikation

Es ist vorteilhaft, wenn die zur spezifischen miRNA-Markierung benötigten Modifikationen direkt auf der Mikroarrayoberfläche anstatt in Lösung durchgeführt werden können, z.B. entfällt die Behandlung der Probe vor der Hybridisierung am Mikroarray. Dies vermeidet mögliche systematische Fehler, die durch eine abweichende Markierung unterschiedlicher miRNAs oder durch Verluste während der Markierungsreaktion und der nachfolgenden Reinigung entstehen können. Außerdem ist es einfacher, mehrstufige Reaktionen sequenziell auf einer Oberfläche durchzuführen als in Lösung. Zudem werden bei einer Festphasenmethode nur miRNAs modifiziert, die an die Oberfläche hybridisiert sind, während in Lösung alle RNA-Moleküle potenziell markierbar sind.

Die in den Abbildungen 4a und 4b (siehe Abschnitt 4) gezeigten Reaktionen sind für eine oberflächenbasierte Markierung ungeeignet, da sie nicht spezifisch für RNA sind und daher auch die Oligonucleotidsonden auf der Mikroarrayoberfläche modifizieren würden. Im Prinzip sollte die Natriumperiodat-Oxidation, die in Abbildung 4c dargestellt ist, für die spezifische Markierung oberflächengebundener miRNAs verwendbar sein, allerdings wurde dies im Mikroarrayformat noch nie nachgewiesen. In diesem Abschnitt stellen wir zwei kürzlich beschriebene Beispiele für miRNA-Nachweisverfahren auf der Grundlage von Oberflächenenzymreaktionen vor.

Wir selbst haben vor kurzem einen neuen Ansatz entwickelt, der eine oberflächenbasierte Poly(A)-Polymerasereaktion und die Signalverstärkung durch DNA-modifizierte Nanopartikel kombiniert und damit einen höchst empfindlichen miRNA-Nachweis durch SPR-Bildgebung auf Mikroarrays erzielt.^[49] Wie in Abbildung 6 dargestellt ist, wird die Ziel-miRNA zunächst aus der Lösung heraus auf einen Mikroarray mit einsträngiger LNA hybridisiert (Schritt 1). Anschließend wird die oberflächengebundene miRNA durch die Poly(A)-Polymerase polyadenyliert (Schritt 2). Das SPRI-Signal wird dann weiter verstärkt durch die Hybridisierungsadsorption von Poly(T) (=T₃₀)-beschichteten Gold-Nanopartikeln (NPs) an die Poly(A)-Enden (Schritt 3).

Die Methode der kombinierten oberflächenbasierten Polyadenylierung/Nanopartikelamplifikation wurde durch den parallelen Nachweis dreier miRNAs verifiziert, die in einer RNA-Probe aus Mäuseleber enthalten waren. Dazu wurde ein Vierkomponenten-Mikroarray konstruiert, der drei zu den bekannten miRNA-Sequenzen (miR-16, miR-122b und miR-23b) komplementäre LNA-Sonden sowie eine DNA-Sonde als Negativkontrolle trug.^[49] Eine RNA-Probe (250 ng) in 500 µL Puffer (0.3 M NaCl/10 mM Phosphat) wurde während 4 h über die Mikroarrayoberfläche gespült, worauf sich eine oberflächenbasierte Amplifikation anschloss. Eine Analyse des daraus entstandenen SPRI-Differenzbildes (Abbildung 7a und des entsprechenden Querschnittsprofils (Abbildung 7c) belegt, dass die Sequenz miR-122b am häufigsten vorkommt. Nach Kalibrieren des SPRI-Signals mit synthetischen Analoga der Zielsequenzen konnten wir die ungefähren miRNA-Konzentrationen zu 20 fm miR-16, 50 fm

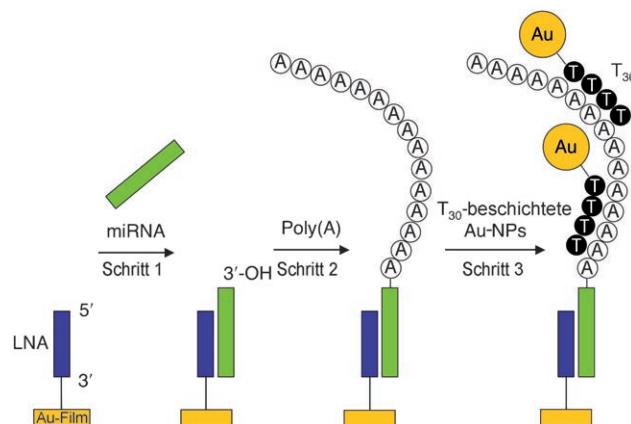


Abbildung 6. miRNA-Nachweis durch oberflächenbasierte Polyadenylierung und nanopartikelverstärkte SPRI. Schritt 1: Hybridisierungsadsorption von miRNA auf ein komplementäres LNA-Array. Schritt 2: Anfügen einer Poly(A)-Kette an das 3'-Ende der oberflächengebundenen miRNAs mithilfe einer Poly(A)-Polymerase. Schritt 3: Hybridisierungsadsorption von Poly(T) (=T₃₀)-beschichteten Gold-Nanopartikeln (NPs) an die Poly(A)-Sequenzen. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [49].

miR-23b und 2 pm miR-122b ermitteln. Die Konzentration der in geringsten Mengen vorliegenden miRNA (miR-16) konnte durch Wiederholung der Messung unter Zusatz von 100 fm synthetischer miR-16 bestätigt werden. In den Abbildungen 7b und c sieht man, dass das SPRI-Signal nur bei den Arrayelementen mit der für miR-16 spezifischen Sonde auf das Fünffache zunahm. Die Nachweisgrenze dieser SPRI-Methode mit integriertem Verstärkungsschritt lag bei 5 attomol (10 fm in 500 µL). Sie ist damit mindestens 50-mal empfindlicher als die fluorimetrischen lösungsbasierten enzymatischen Verlängerungs-/Markierungsverfahren, die im vorherigen Kapitel diskutiert wurden.

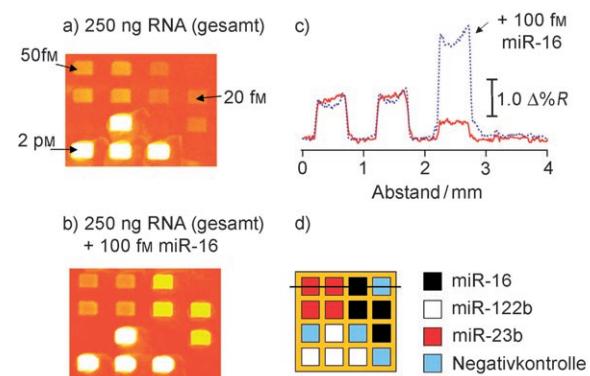


Abbildung 7. Quantitative Analyse von miRNAs aus der Gesamt-RNA von Mäuseleber (250 ng) durch Polyadenylierung/nanopartikelamplifizierte SPRI. a) SPRI-Differenzaufnahme, die durch Subtraktion der Bilder vor und nach dem Nanopartikelamplifikationsschritt erhalten wurde. b) SPRI-Differenzbild eines anderen Chips mit der gleichen RNA-Konzentration wie unter (a) zuzüglich 100 fm synthetischer miR-16. c) Vergleich der Querschnittsprofile beider SPRI-Differenzbilder; die durchgezogene Linie stammt vom oberen, die gepunktete Linie vom unteren Bild. d) Schema des Vierkomponenten-Mikroarrays; schwarze Linie: Querschnittsprofil. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [49].

Ein anderes Beispiel einer oberflächenbasierten enzymatischen Amplifizierungsreaktion für den Nachweis von miRNA ist der RAKE-Ansatz (RNA-primed array based Klenow enzyme).^[25,50,51] Dieser Test beruht auf der Fähigkeit von miRNA-Molekülen, als Primer für die Klenow-Polymerasereaktion zu fungieren, wenn die miRNA vollständig mit einer ssDNA-Sonde gepaart ist. Unter der Voraussetzung, dass keine Fehlpaarung vorliegt, wird das 3'-Ende der miRNA mit biotinkonjugierten Nucleotiden verlängert. Die Anzahl hängt von der als Matrize wirkenden DNA-Sonde ab. Die Mikroarrayelemente, die hybridisierte und Klenow-verlängerte miRNAs tragen, werden mit streptavidinkonjugierten Fluorophoren sichtbar gemacht und quantifiziert. Die Nachweisempfindlichkeit des RAKE-Ansatzes ist ähnlich wie bei anderen fluoreszenzbasierten Mikroarrays, die ebenfalls auf der Anbindung einer einzelnen Markierung beruhen.^[24] Allerdings lassen sich mit RAKE die Schritte zur Probenvorbereitung (Markierung oder Amplifikation vor der Hybridisierung) vermeiden; außerdem ist der Ansatz hochspezifisch mit einer exzellenten Differenzierung zwischen miRNAs, die sich in der Modifikation ihrer 3'-Enden unterscheiden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Es besteht kein Zweifel, dass Verfahren zur schnellen, hochempfindlichen miRNA-Profilierung zunehmend gefragt sein werden, je tiefer die biochemische Forschung in die komplexen Funktionen der miRNAs in regulatorischen Netzwerken eindringt. Die ideale Methode zur miRNA-Profilierung hat folgende Merkmale: 1) einfache Anwendung im Multiplexmodus; 2) systematische Messfehler durch erhöhtes Ansprechverhalten auf bestimmte miRNA-Sequenzen sind vernachlässigbar; 3) einfache experimentelle Schritte mit einem Minimum an Probenmanipulation vor der Hybridisierung; 4) großer dynamischer Messbereich von subfemtobis nanomolaren Konzentrationen. Diese ultimative Technik existiert zwar noch nicht, doch kommen aktuelle Entwicklungen mit Mikroarraysystemen in Kombination mit chemischen und enzymatischen miRNA-Markierungsstrategien diesem Idealziel sehr nahe. Bislang werden die meisten miRNA-Markierungsreaktionen in Lösung durchgeführt und benötigen einen oder mehrere Reaktionsschritte. Neuere Verfahren beruhen auf oberflächenbasierten Enzymreaktionen, die eine einfache Entfernung der Reagentien erlauben, da die selektive Markierung der miRNAs nach der Hybridisierungsadsorption an die Sonde auf der Mikroarrayoberfläche stattfindet. Ein weiterer Vorzug dieser neuen oberflächenbasierten Markierungsstrategien besteht darin, dass mehrere Fluorophore oder mehrere Nanopartikel an eine einzelne miRNA konjugiert werden können. Es muss aber beachtet werden, dass die Signalhöhen dieser Nachweismethoden weniger exakt kontrollierbar und quantifizierbar sind. Für die nicht allzu ferne Zukunft erwarten wir eine Reihe neuer, quantitativer und hochempfindlicher Ansätze für die Profilierung der miRNA-Expression mit Mikroarrays, die eine detaillierte Untersuchung der Rolle von miRNAs in biologischen Systemen ermöglichen.

Wir danken den National Institutes of Health (2 RO1 GM059622-04), der National Science Foundation (CHE-0551935) und dem DARPA Micro/Nano Fluidics Fundamentals Focus (MF3) Center der UCI für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 5. Juni 2007
Online veröffentlicht am 12. November 2007

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] V. Ambros, B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, T. Tuschl, *RNA* **2003**, *9*, 277.
- [2] D. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281.
- [3] L. He, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522.
- [4] V. N. Kim, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 376.
- [5] A. E. Pasquinelli, S. Hunter, J. Bracht, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 200.
- [6] C. Arenz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5048.
- [7] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, *75*, 843.
- [8] V. Ambros, *Nature* **2004**, *431*, 350.
- [9] R. W. Carthew, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2006**, *16*, 203.
- [10] A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. V. Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. A. Miska, D. Vtrie, K. Okkenhaug, A. J. Enright, G. Dougan, M. Turner, A. Bradley, *Science* **2007**, *316*, 608.
- [11] A. Esquela-Kerscher, F. J. Slack, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 259.
- [12] G. A. Calin, C. M. Croce, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857.
- [13] M. S. Kumar, J. Lu, K. L. Mercer, T. R. Golub, T. Jacks, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 673.
- [14] S. Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D109.
- [15] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. V. Dongen, A. Bateman, A. J. Enright, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D140.
- [16] I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 766.
- [17] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Soccia, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.-U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichten, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, *Cell* **2007**, *129*, 1401.
- [18] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* **2001**, *294*, 853.
- [19] H. T. Allawi, J. E. Dahlberg, S. Olson, E. Lund, M. Olson, W.-P. Ma, T. Takova, B. P. Neri, V. I. Lyamichev, *RNA* **2004**, *10*, 1153.
- [20] T. D. Schmittgen, J. Jiang, Q. Liu, L. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e43.
- [21] C. K. Raymond, B. S. Roberts, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, J. M. Johnson, *RNA* **2005**, *11*, 1737.
- [22] C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, K. J. Guegler, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e179.
- [23] T. Babak, W. Zhang, Q. Morris, B. J. Blencowe, T. R. Hughes, *RNA* **2004**, *10*, 1813.
- [24] J. M. Thomson, J. Parker, C. M. Perou, S. M. Hammond, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 47.
- [25] P. T. Nelson, D. A. Baldwin, L. M. Scearce, J. C. Oberholzer, J. W. Tobias, Z. Mourelatos, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 155.

- [26] C.-G. Liu, G. A. Calin, B. Meloon, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9740.
- [27] O. Barad, E. Meiri, A. Avniel, R. Aharonov, A. Barzilai, I. Bentwich, U. Einav, S. Gilad, P. Hurban, Y. Karov, E. K. Loberhofer, E. Sharon, Y. M. Shibolet, M. Shtutman, Z. Bentwich, P. Einat, *Genome Res.* **2004**, *14*, 2486.
- [28] E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, M. Townsend, A. Yoshii, N. Sestan, P. Rakic, M. Constantine-Paton, R. Horvitz, *Adv. Genome Biol.* **2004**, *5*, R68.
- [29] L. A. Goff, M. Yang, J. Bowers, R. C. Getts, R. W. Padgett, R. P. Hart, *RNA Biol.* **2005**, *2*, 93.
- [30] S. Baskerville, D. P. Bartel, *RNA* **2005**, *11*, 241.
- [31] M. Castoldi, S. Schmidt, V. Benes, M. Noerholm, A. E. Kulozik, M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, *RNA* **2006**, *12*, 913.
- [32] I. Beuvinkiy, F. A. Kolb, W. Budach, A. Garnier, J. Lange, F. Natt, U. Dengler, J. Hall, W. Filipowicz, J. Weiler, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e52.
- [33] D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, *Nature* **2000**, *405*, 827.
- [34] H. Wang, R. A. Ach, B. Curry, *RNA* **2007**, *13*, 151.
- [35] A. Valoczi, C. Hornyik, N. Varga, J. Burgyan, S. Kauppinen, Z. Havelda, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e175.
- [36] E. Wienholds, W. P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. D. Bruijn, H. R. Horvitz, S. Kauppinen, R. H. A. Plasterk, *Science* **2005**, *309*, 310.
- [37] W. P. Kloosterman, E. Wienholds, E. D. Bruijn, S. Kauppinen, R. H. A. Plasterk, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 27.
- [38] M. Deo, J.-Y. Yu, K.-H. Chung, M. Tippens, D. L. Turner, *Dev. Dyn.* **2006**, *235*, 2538.
- [39] L. A. Neely, S. Patel, J. Garver, M. Gallo, M. Hackett, S. McLaughlin, M. Nadel, H. Harris, S. Gullans, J. Rooke, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 41.
- [40] H. J. Lee, A. W. Wark, R. M. Corn, *Langmuir* **2006**, *22*, 5241.
- [41] A. W. Wark, H. J. Lee, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3904.
- [42] H. J. Lee, Y. Li, A. W. Wark, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5096.
- [43] J. M. Enos, J. L. Duzeski, P. L. Roesch, J. E. Hagstrom, M.-A. V. Watt, *Biotechniques* **2007**, *42*, 378.
- [44] A. Garnier, D. Hüskens, J. Weiler, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1181.
- [45] R. Liang, W. Li, Y. Li, C. Tan, J. Li, Y. Jin, K. Ruan, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e17.
- [46] Z. Gao, Z. Yang, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1470.
- [47] J. Shingara, K. Keiger, J. Shelton, L. Laosinchai-Wolf, P. Powers, R. Conrad, D. Brown, E. Labourier, *RNA* **2005**, *11*, 1461.
- [48] M. D. Mattie, C. C. Benz, J. Bowers, K. Sensinger, L. Wong, G. K. Scott, V. Fedele, D. Ginzinger, R. Getts, C. Haqq, *Mol. Cancer* **2006**, *5*, 24.
- [49] S. Fang, H. J. Lee, A. W. Wark, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14044.
- [50] P. T. Nelson, D. A. Baldwin, W. P. Kloosterman, S. Kauppinen, R. H. A. Plasterk, Z. Mourelatos, *RNA* **2006**, *12*, 187.
- [51] E. Berezikov, G. V. Tetering, M. Verheul, J. V. D. Belt, L. V. Laake, J. Vos, R. Verloop, M. V. D. Wetering, V. Guryev, S. Takada, A. J. V. Zonneveld, H. Mano, R. Plasterk, E. Cuppen, *Genome Res.* **2006**, *16*, 1289.
- [52] S. H. Ramkisson, L. A. Mainwaring, E. M. Sloand, N. S. Young, S. Kajigaya, *Mol. Cell. Probes* **2006**, *20*, 1.
- [53] J. S. Hartig, I. Grune, S. H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 722.
- [54] P. Y. Chen, H. Manninga, K. Slanchev, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, B. John, D. S. S. Marks, D. Gaidatzis, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1288.
- [55] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Nature* **2005**, *435*, 828.
- [56] S. P. Jonstrup, J. Koch, J. Kjems, *RNA* **2006**, *12*, 1747.
- [57] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, T. R. Golub, *Nature* **2005**, *435*, 834.