

Hochempfindliches, nichtradioaktives Nukleinsäure-Footprinting mit Hilfe eines automatischen DNA Sequencers

12058 BR

Der Nachweis von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen besitzt eine große Bedeutung in der biochemischen, medizinischen und pharmazeutischen Forschung, da viele Zellprozesse (z. B. Gen-Transkription, Differenzierung, Regulation, Signaltransduktion, pathophysiologische Veränderungen) über diese Komplexe gesteuert werden. In den letzten Jahren hat sich die Proteomforschung so rasant entwickelt, daß die dabei neu identifizierten Protein-Targets durch funktionelle Studien validiert werden müssen. Hierzu sind schnelle Methoden, z. B. zur Ermittlung der spezifischen DNA/RNA-Protein-Wechselwirkung auf der molekularen Ebene notwendig. Das Footprinting ist ein sehr effizientes Verfahren, um solche Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu analysieren (Ermittlung der sequenz- oder strukturspezifischen Kontaktbereiche einer Nukleinsäure-Protein-Interaktion). Die Sequenzbereiche der Nukleinsäure, die durch Bindung des Proteins überdeckt sind, sind vor der Spaltung mit Nukleasen geschützt, während die freien Bereiche der Nukleinsäure verdaut und abgetrennt werden können. Hierzu wird die zu untersuchende Nukleinsäure radioaktiv markiert, um eine hohe Sensitivität der Analyse der Bindungsstelle zu ermöglichen. Anstelle der bisher verwendeten Methode mittels radioaktiver Markierung der Nukleinsäuren wurden in diesem Projekt verschiedene Möglichkeiten der Fluoreszenz-Markierung untersucht, die ohne radioaktive Reagenzien zum Ziele führen. Es wurden mehrere alternative Methoden ausgearbeitet, die zu einem kostengünstigen Testverfahren für das Durchmustern großer Probenzahlen geeignet wären. Die Analyse der Bindungsstellen wird normalerweise durch Sequenzierung der spezifischen Sequenzregionen der Bindungspartner ermittelt. Als Ergebnis der Untersuchungen kann festgestellt werden, daß die ausgearbeitete Fluoreszenzmarkierung in Kombination mit moderner Chip-basierter Technologie die größten Aussichten für die Realisierung eines geeigneten Schnelltests hat. Dadurch kann eine höhere Sensitivität als durch Analyse im Sequencer erreicht werden.

Bearbeitet wurde das Forschungsthema von 5/99 bis 4/02 am **Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin** (Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Tel.: 030 / 9406-0) unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Wittmann-Liebold (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. D. Ganten).

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

Das IGF-Vorhaben Nr. 12058 BR der Forschungsvereinigung DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages