

LABORWELT

Nr. 6 / 2006 - Vol. 7

Das BioTechnologie -Themenheft

RNAi als Grundlage
neuer Therapeutika:
aktueller Stand

Drug Delivery
therapeutischer
siRNA-Moleküle

RNAi-Knock-out

Species-übergreifende
Ressource für RNAi-
Daten und Phänotypen

Marktübersicht:
PCR-Kits

Large Scale
RNAi-Screens für
Maus und Mensch

Mausmodelle: Target-
Validierung in vivo

Optimierung des
siRNA-vermittelten
Gene Silencing



Gene knockdown – it's never been this easy



Achieve greater knockdown with *sub-nanomolar concentrations* of DsiRNA

Our new Diceror™ product line utilizes Dicer-Substrate (DsiRNA) technology developed in a collaborative effort with Prof. John Rossi (Beckman Research Institute of the City of Hope)¹.

DsiRNA constructs are designed to be processed by Dicer with target-specific end products. Sustained knockdown has been regularly achieved using sub-nanomolar to low-nanomolar concentrations².

Improve your gene knockdown results with any of our superior Diceror™ products:

- Custom DsiRNA duplexes
- Premade controls
- TriFECTa™ kits - includes three custom DsiRNA duplexes and premade controls for transfection experiments. IDT guarantees 70% knockdown of target mRNA from 2 of the 3 duplexes*.
- Predesigned Genome Library - eight genomes including human, mouse and rat

Knockdown gene expression with Diceror™ products from IDT!
Go to www.idtdna.com/diceror for more information.

References:

1. Kim, D.-H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.-S., Choi, S., and Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*, 23:222-226.
2. Rose, S.D., Kim, D.-H., Amarguilou, M., Heidel, J.D., Collingwood, M.A., Davis, M.E., Rossi, J.J., and Behlke, M.A. (2005) Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 33:4140-4156.

* Knockdown guaranteed when >90% transfection efficiency and >90% knockdown with positive control are demonstrated.

These products are not for use in Humans or Non-Human animals and may not be used for Human or Veterinary Diagnostic, Prophylactic or Therapeutic purposes.


INTEGRATED DNA
TECHNOLOGIES, INC.

Innovation and Precision in Nucleic Acid Synthesis

www.idtdna.com

800.328.2661



Zum Thema ▼

Siegeszug der RNA-Interferenz

Spätestens seit der diesjährigen Nobelpreisvergabe ist die RNA-Interferenz (RNAi) in aller Munde. Mitte Dezember werden die US-Forscher Craig Mello und Andrew Fire den wohl renommiertesten Wissenschaftspreis in Stockholm in Empfang nehmen (vgl. S. 4). Angesichts Tausender von Publikationen seit Entdeckung der RNAi beim Fadenwurm *C. elegans* hatte das Nobel-Komitee es nicht leicht mit der Auswahl – trotz zahlreicher bahnbrechender Anwendungen entschieden sich die Juroren diesmal für die Erstbeschreibung des Phänomens.

Diese Themenausgabe widmet sich den aktuellen Anwendungen der RNAi-Technologie, die klassische Verfahren zur Genfunktionsbestimmung ergänzt. Der Focus liegt dabei auf neuen Optionen, die die RNA-Interferenz in Forschung und Klinik eröffnet – sei es in Krankheitsmodellen (vgl. S. 11), der klinischen Wirkstoffentwicklung (vgl. S. 29) und dem damit eng verknüpften Wirkstofftransport (vgl. S. 6), bei der Genfunktionszuordnung (vgl. S. 18-26) oder der Nutzung von Orthologiebeziehungen mit Hilfe neuer Datenbank-Werkzeuge (vgl. S. 14). Auch *in vivo*-Nebenwirkungen und das Überlappen mit natürlichen RNA-Regulationsmechanismen werden diskutiert (vgl. S. 18, 22).

Bitte nutzen Sie unseren **Kennziffer-Service**: online unter www.biocom.de oder auf unserer **Fax-Seite** (S. 48). Wenn Sie ein Produkt interessiert, einfach Nummer ankreuzen, Name und Adresse angeben und faxen/mailen – Sie erhalten umgehend Informationen unserer Inserenten.

Mit einem Sonderbeitrag zum Thema MRSA-Diagnostik (vgl. S. 27) begrüßt LABORWELT zudem insgesamt 1.900 neue Leser aus der medizinischen Mikrobiologie – die Mitglieder unseres neuen Partnerverbandes Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Herzlich willkommen!

Die Redaktion freut sich über Ihre thematischen Anregungen, Diskussionsbeiträge, Statements zu politisch heißen Eisen und natürlich auch, wenn Sie unseren kostenfreien akademischen Stellenmarkt nutzen (s. S. 41). Mit der stärkeren Orientierung in Richtung Medizin wird LABORWELT, eine gemeinsame Plattform für biologische und medizinische Inhalte schaffen.

Mit den neuen Lesern kommt LABORWELT auf aktuell 20.000 qualifizierte Fachleser aus Biowissenschaften und Medizin in Deutschland, Österreich und der Schweiz, wie durch die Vergabe des IVW-Logos zur Auflagenkontrolle seit kurzem auch verlässlich dokumentiert ist.

Wir hoffen sehr, daß Sie dieses wissenschaftliche Forum weiterhin rege nutzen werden und freuen uns über jeden Hinweis auf neuentwickelte, spannende Methoden und Publikationen, die wir auch künftig zeitnah in die Wissenschaftsgemeinschaft transportieren werden.

Thomas Gabrielczyk



Anders als beim Boxen dient der Knock-down mit Hilfe der RNA-Interferenz dem Informationsgewinn. Mit kurzen doppelsträngigen RNAs lassen sich Genfunktionen durch gezielte mRNA-Zerstörung ermitteln.

Kennziffer **11 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de

INHALT

STATEMENT

- ▶ Was die Nobelpreise für die Entwicklung der RNA-Technologien bedeuten 4
Prof. Dr. Volker Erdmann, Freie Universität Berlin

REPORT

- ▶ Einschleusung therapeutischer siRNA-Moleküle 6
HD Dr. Achim Aigner et al., Philipps-Universität Marburg

BLITZLICHT

- ▶ Target-Validierung *in vivo* 11
Dr. Jost Seibler et al., Artemis Pharmaceuticals GmbH, Köln

WISSENSCHAFT

- ▶ PhenomicDB: speziesübergreifende Ressource für RNAi-Daten und klassische Phänotypen 14
Dr. Bertram Weiss et al., Bayer Schering Pharma AG, Berlin

BLITZLICHT

- ▶ Optimierung des siRNA-vermittelten Gene Silencing 18
Dr. Steve Kulisch et al., Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

BLITZLICHT

- ▶ siRNA-Design: Voraussetzung für effiziente Geninaktivierung 22
Dr. Eric Lader et al., Qiagen Sciences, Germantown, USA

BLITZLICHT

- ▶ Neue Plattform für zellbasierte Genfunktions-Analysen 24
Dr. Christian Thirion et al., Sirion GmbH, Martinsried

BLITZLICHT

- ▶ Large Scale RNAi-Screens in Maus und Mensch 26
Dr. Andreas Hewelt, RZPD GmbH, Berlin

BLITZLICHT

- ▶ Sensitive Schnelldiagnostik von *S. aureus* und MRSA 27
Dr. Urs Wick et al., Biosynth AG, Staad, Schweiz

BLITZLICHT

- ▶ RNAi als Grundlage neuer Therapeutika – der aktuelle Entwicklungsstand 29
Dr. Roland Kreuzer, Alnylam Europe AG, Kulmbach

MARKTÜBERSICHT

- ▶ Fast cycling PCR – höherer Durchsatz durch Zeitersparnis 32
Dr. Ulla Deutsch, Dr. Dirk Löffert, Qiagen GmbH, Hilden

MARKTÜBERSICHT

- ▶ PCR-Kits 34
- ▶ Verbände 40
- ▶ Stellenmarkt 41
- ▶ Fax-Seite 48
- ▶ Produktwelt 49
- ▶ Termine/Impressum 50

Was die Nobelpreise für die RNA-Technologien bedeuten

Prof. Dr. Volker A. Erdmann, FU Berlin und Berliner Netzwerk für RNA-Technologien

Selten hat eine Entdeckung so schnell zu der Verleihung eines Nobelpreises geführt wie die der RNA-Interferenz (RNAi), für die Andrew Z. Fire (Stanford University) und Craig C. Mello (University of Massachusetts) den diesjährigen Nobelpreis für Medizin erhalten. Und noch seltener hat sich die Industrie so schnell und mit einem derartigen finanziellen Aufwand einer Entdeckung zugewandt. Was also steckt hinter der sogenannten RNA-Interferenz, die den Interferenz-Teil ihres Namens aus der Physik übernommen hat? Warum das unmittelbare Interesse der Industrie an dieser Entdeckung? Weshalb wurden nicht deutsche Wissenschaftler wie Thomas Tuschl an dem Nobelpreis beteiligt? Und was bedeutet die Vergabe der Nobelpreise für Medizin und zusätzlich für Chemie an Roger Kornberg (ebenfalls Stanford University) – für seine Arbeiten zur Struktur und Funktion der RNA-Polymerase – für die Zukunft der RNA-Technologien? Wie stark ist die Bundesrepublik Deutschland heute und morgen an der Erforschung und Entwicklung der RNA-Technologien beteiligt? Und wie wird dieser Einsatz von der internationalen Konkurrenz eingeschätzt? Was kommt eigentlich nach RNAi und der RNA-Polymerase? All diese Fragen sind hochinteressant und verlangen auch den Blick in die Zukunft.

Einzigartiges Werkzeug zum Stummschalten von Genen

Die RNAi-Methode ist durch ihr Potential, hochspezifisch RNA-Moleküle zu zerschneiden, hervorragend für die Inaktivierung von messenger-RNAs (mRNAs) geeignet. Konsequenz dieser hydrolytischen Aktivität ist, daß die entsprechenden Proteine nicht mehr hergestellt werden und ihre Funktionen für die Zelle oder ein Virus verlorengehen. Es scheint beinahe so, als ob die Molekularbiologen, Biotechnologen, Mediziner und die Industrie förmlich auf diese Methode gewartet haben, denn nur so ist zu erklären, daß die RNA-Interferenz wie ein Lauffeuer beinahe jedes biochemische Labor in der Welt erobert hat.

Darüber hinaus besteht die Hoffnung, mit der RNA-Interferenz künftig möglicherweise Tumorerkrankungen und Virusinfektionen behandeln zu können, darüber hinaus Phänotypisierungen und Transfektionsoptimie-

rungen durchzuführen, so daß allein in der Pharmaindustrie in absehbarer Zeit mit Milliarden Euro-Umsätzen pro Jahr zu rechnen ist. Bevor allerdings diese Ziele erreicht werden, müssen noch Delivery-Verfahren mit höchster Targetspezifität entwickelt werden.

Nicht nur die Forscher auf diesem Gebiet, sondern auch die Industrie ist von der Zukunft der Technologie bereits jetzt so überzeugt, daß zum Beispiel Novartis eine Investition von bis zu 700 Millionen US-\$ für das auf siRNA-Wirkstoffe spezialisierte Unternehmen Alnylam Pharmaceuticals vertraglich festgelegt hat. GlaxoSmithKline stellt dem Alnylam-Konkurrenten Sirna, vormals Ribozyme Pharmaceuticals, einen Betrag von US-\$ 700 Millionen in Aussicht, sofern bestimmte Entwicklungsziele bei einer Reihe von Arzneimittelkandidaten erreicht werden.

Auszeichnung für Erstentdeckung

Nachdem Fire und Mello die RNA-Interferenz erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt hatten, übertrugen eine Reihe anderer Wissenschaftler den Mechanismus auf weitere Systeme. Da der deutsche Wissenschaftler Thomas Tuschl maßgeblich daran beteiligt war zu zeigen, daß kurze synthetische RNA-Moleküle auch bei Säugerzellen die RNA-Interferenz auslösen können, wurde vielerorts erwartet, daß auch er bei der Vergabe des Nobelpreises mit dabei sein würde. Das Nobelpreiskomitee hat sich leider anders entschieden, und man kann diese Entscheidung auch respektieren, wenn davon ausgegangen wird, daß sich das Komitee ausschließlich auf die Erstentdecker beschränken wollte.

Die Vergabe der diesjährigen Nobelpreise für die Bereiche der Medizin und der Chemie bestätigt auch das große Interesse, das den RNA-Technologien gerade durch die wissenschaftliche Presse seit zwei bis drei Jahren entgegengebracht wird. Wer erinnert sich nicht an die zahlreichen internationalen Journale, die auf ihren Coverseiten die Aktualität der RNA-Technologien dokumentierten, und die vielen Kommentare und Besprechungen der Technologien in renommierten Journalen wie NATURE, NATURE BIOTECHNOLOGY und SCIENCE.

Angesichts der rapiden Entwicklung des Forschungsthemas erscheint es heute als glückliche Entscheidung, daß bereits vor acht



Prof. Dr. Volker A. Erdmann (65) ist Inhaber des Lehrstuhls für Biochemie und Molekularbiologie der Freien Universität Berlin und Initiator und Vorstandsvorsitzender des Berliner Netzwerkes für RNA-Technologien. Durch seine Expertise auf dem Gebiet der RNA-Biochemie und Genexpression (mehr als 420 Publikationen, zahlreiche Patente) gehört er zu den Vorreitern bei der Etablierung der RNA-Technologien in Deutschland. Prof. Erdmann studierte bis zum M.Sc. an der University of New Hampshire und promovierte 1968 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen und der Technischen Universität in Braunschweig. Nach einer Postdoktorandenzeit an der University of Wisconsin in Madison (1969-71) und als Arbeitsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin (1971-80) folgte Prof. Erdmann dem Ruf auf den Lehrstuhl an der FU Berlin.

Jahren das Berliner Netzwerk für RNA-Technologien ins Leben gerufen wurde – zu einer Zeit, als die Gründung eines Netzwerkes mit diesem Fokus äußerst risikoreich erscheinen mußte. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), der Senat von Berlin und die Industrie verpflichteten sich bereits damals die Kosten für die gesamte zehnjährige Förderperiode zu gleichen Teilen zu übernehmen. Auch die Deutsche Forschungsgemeinschaft trug durch ihre Schwerpunktprogramme zur RNA-Biochemie maßgeblich zur Stärkung der RNA-Grundlagenforschung in Deutschland bei. Ob der Umfang der Förderung mit Blick auf die neuen Aspekte, die sich nun für die RNA-Technologien ergeben, in der Zukunft deutlich ausgebaut wird, erwartet die Forschung mit Spannung. Wie unlängst auf einer von 150 Wissenschaftlern besuchten Tagung der Fachgruppe Biochemie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Kassel klar wurde, besteht großes Interesse, das Berliner Netzwerk für RNA-Technologien zu einem bundesweiten „Deutschen Netzwerk für RNA-Technologien“ auszubauen.

Auch die internationale Konkurrenz hat die Bedeutung des Themas längst erkannt. Erst im vergangenen Jahr besuchte eine japanische Delegation das Berliner Netzwerk für

RNA-Technologien, um sich über dessen Aufbau und Organisation zu informieren. Hintergrund des Besuchs: die Delegation vertritt ein Konsortium von 92 Firmen mit dem Auftrag, in Japan ein Netzwerk für den Bereich der sogenannten noncoding RNAs zu gründen. In diesem Jahr gab es zudem eine Vortrags- und Diskussionsrunde mit französischen RNA-Forschern in Berlin, mit dem Ziel bei einer ins Auge gefaßten Gründung eines RNA-Netzwerkes in Frankreich behilflich zu sein.

Zukunft der RNA-Technologien

Weil die RNA-Interferenz indessen als natürlicher Regulationsmechanismus etabliert ist und siRNAs als eine vielversprechende neue Wirkstoffklasse eingeschätzt werden, ergibt sich die Frage, was in der Zukunft von den RNA-Technologien noch zu erwarten ist. Zunächst einmal kommt hierzu vielleicht ein Hinweis vom Nobelpreiskomitee, und zwar mit der Vergabe des diesjährigen Nobelpreises für Chemie an Roger Kornberg für seine Arbeiten über die RNA-Polymerase. Für die Arbeiten an dem Enzym also, das unter anderem den Regulator siRNA synthetisiert und reguliert. Damit dürfte die RNA-Polymerase nicht nur von akademischem Interesse sein.

Mit den microRNAs stehen zudem weitere kleine noncoding RNAs zur Verfügung, die ebenfalls regulatorisch in die Genexpression eingreifen und – zumindest in der Theorie – für künftige therapeutische Maßnahmen geeignet erscheinen. Aber auch die Riboswitches, die zunächst nur bei Bakterien als Regulatoren der Genexpression beschrieben wurden, wären auch für einen Einsatz in Eukaryonten denkbar und somit – wiederum theoretisch – therapeutische Maßnahmen der Zukunft. Neben den bisher erwähnten kleinen noncoding RNAs, von denen es, vorsichtig geschätzt, einige Tausend in der Zelle gibt, existieren auch große noncoding RNAs mit einer den messenger-RNAs vergleichbaren Länge. Im Gegensatz zu diesen werden sie allerdings nicht translatiert. Bisherige Schätzungen ergeben hier, daß für diese noncoding RNAs auf den Chromosomen des Menschen zwischen 40.000 und 65.000 Loci existieren (also doppelt soviel „Gene“ als für Proteine) und daß niedriger einzustufende Lebewesen bedeutend kleinere Zahlen dieser „Gene“ besitzen. Zur Zeit sind von weniger als hundert humanen noncoding RNAs die Funktionen bekannt. Eines erscheint aber bereits sicher: daß die noncoding RNAs regulatorisch von Bedeutung sein müssen, da die bisher identifizierten Moleküle entweder mit Tumorerkrankungen oder mit vererbten Krankheiten in Zusammenhang stehen. Es ist also durchaus denkbar, daß die Regulation dieser noncoding RNAs sich als therapeutisch relevant erweisen könnte.

Neben den kleinen und großen, regulatorischen noncoding RNAs zählen auch katalytisch aktive RNAs (Ribozyme), Antisensemoleküle, hochaffine Nukleinsäuren (Aptamere und Spiegelmere) sowie *in vitro*-Systeme zur zellfreien Proteinbiosynthese, zu den RNA-Technologien und bieten ein gewaltiges Potential für die Biotechnologie und Medizin.

Zusammenfassend muß also festgestellt werden, daß die Entwicklung der RNA-Technologien mit ihren vielseitigen Möglichkeiten rasant voranschreitet und sich momentan erst am Anfang befindet; daß für diesen Bereich eine glänzende Zukunft in den kommenden 20 Jahren in Wirtschaft und Medizin vorausgesagt werden kann; daß Deutschland auf diesem Gebiet bisher zu den weltweit führenden Nationen gehört, nichtsdestotrotz aber erhebliche Anstrengungen erforderlich sein werden, die den derzeitigen finanziellen Rahmen um einiges überschreiten. Die Gründung eines Deutschen Netzwerkes für RNA-Technologien erscheint unabdingbar, damit die Grundlagen- und angewandte Forschung durch innovative Finanzierungsmöglichkeiten den Handlungsspielraum erhält, sich weiter gegen die immer stärker werdende internationale Konkurrenz erfolgreich zu behaupten.



Perfekt trocken

Der perfekte "Dry Martini" ist eine Kunst - perfekt trockene organische Proben ebenso, es sei denn, Sie verwenden den Genevac HT- 4X Evaporator.

Nur der HT-4X oder die größeren Systeme HT-8 und HT-12 vereinen patentierte Technologien wie Dri-Pure™, Sample Guard™ und Coolheat® um den Trocknungsvorgang Ihrer Proben mit absoluter Präzision zu kontrollieren.



Diese "High Troughput" Evaporatoren bieten das Maximum an Geschwindigkeit und Sicherheit ohne ständige Kontrollen oder Einschränkungen.

Leider machen sie (noch) keine "Dry Martinis" .

Genevac®
Evaporation pure and simple

Genevac Ltd Farthing Road Ipswich UK IP1 5AP
Telephone +44 (0)1473 240000
Fax +44 (0)1473 742987
www.genevac.com

Fordern Sie unsere Produktbroschüre an :
www.genevac.de/products/range.html
oder per Telefon / Fax

Einschleusung therapeutischer siRNA-Moleküle

HD Dr. Achim Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Forschungseinheiten, Philipps-Universität Marburg

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) sind Gentergating-Strategien auch im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika wieder im Mittelpunkt des Interesses. RNAi basiert auf der intrazellulären Wirkung kleiner doppelsträngiger RNA-Moleküle (siRNAs), die jedoch dazu erst ihren Wirkort erreichen müssen. Die Applikation therapeutischer siRNAs *in vivo* kann über verschiedene Strategien gelingen. Polyethylenimine (PEIs) gestatten den Schutz von siRNAs vor Degradation sowie ihre zelluläre Einschleusung und Freisetzung. Sie können so – zumal nach chemischen Modifikationen und Funktionalisierungen – eine attraktive Plattform für den therapeutischen Einsatz von siRNAs bieten.

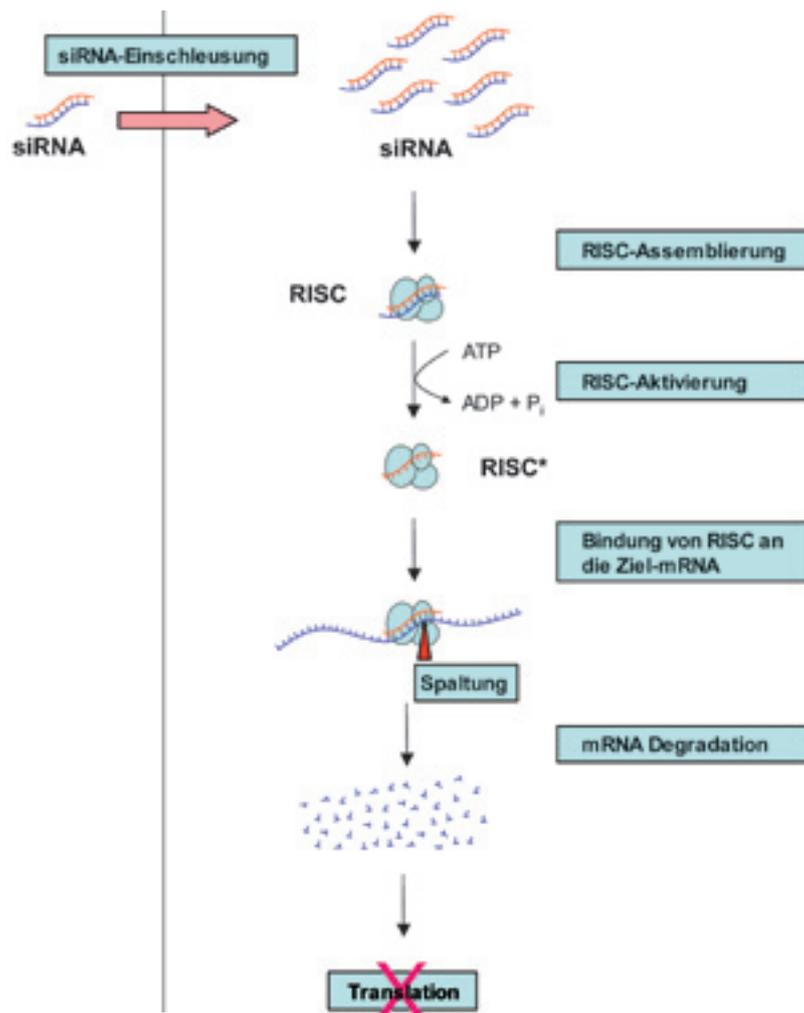


Abb. 1: Mechanismus der RNA-Interferenz. Kleine doppelsträngige siRNA-Moleküle werden in den RISC-Komplex eingebaut und binden nach dessen Aktivierung sequenzspezifisch an ihre Ziel-mRNA. RISC kann nun die mRNA spalten, die daraufhin rasch abgebaut wird und nicht mehr zur Translation zur Verfügung steht. Zur Induktion von RNAi genügt die Einschleusung der siRNA-Moleküle, da alle anderen Komponenten in der Zelle vorhanden sind, und auch die natürlicherweise vorgeschaltete intrazelluläre Prozessierung längerer doppelsträngiger RNA-Moleküle zu siRNAs (nicht gezeigt) ist prinzipiell nicht nötig.

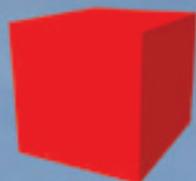
Bei vielen Erkrankungen, zum Beispiel bei Krebs, viralen Infektionen, neurodegenerativen Erkrankungen oder der Macula-Degeneration, spielt eine veränderte oder gesteigerte Expression bestimmter Gene eine zentrale Rolle. Therapeutische Ansätze können demzufolge auf die Inhibition dieser als relevant erkannten Gene oder Genprodukte abzielen. Dabei kommen auch sogenannte Gentergating-Strategien in Frage, die darauf abzielen, die Expression eines Targetgens ganz auszuschalten oder zumindest zu bremsen.

Nach der Antisense-Technologie und dem Ribozym-Targeting wurde mit der RNA-Interferenz (RNAi) Ende der neunziger Jahre ein weiterer Mechanismus zur selektiven Inhibition der Genexpression aufgeklärt. Schnell wurde erkannt, daß RNAi eine besonders effiziente und – zumindest *in vitro* – einfach anzuwendende Methode ist, um Gene auszuschalten. Entsprechend rasch hat vor allem *in vitro* die Verwendung von RNAi-basierten Ansätzen, etwa in Genfunktionsstudien oder in High-Throughput-Analysen, zugenommen.

RNAi: vom Mechanismus zur siRNA

RNAi ist ein sequenzspezifischer und posttranskriptionell ansetzender Mechanismus, der auf kurzen, doppelsträngigen RNA-Molekülen beruht. Die Entdeckung der RNAi in *C. elegans* durch Fire et al.¹ wurde kürzlich mit dem Nobelpreis ausgezeichnet; es wurde auch rasch klar, daß RNAi – wenngleich vom Mechanismus her komplizierter – auch in höheren Organismen vorkommt. RNAi beruht auf einem mehrere Schritte umfassenden intrazellulären Weg, der in zwei Phasen aufgeteilt werden kann: die Initiationsphase, in der doppelsträngige RNA-Moleküle endogen (z.B. miRNA) oder exogenen Ursprungs durch die Spaltungsaktivität eines Proteins vom Ribonuklease III-Typ (Dicer) in kleine, 21 bis 23 Basenpaare (bp) umfassende siRNAs (small interfering RNAs) prozessiert werden, und die Effektor-Phase, wo diese siRNAs in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut werden und die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt. Hierzu binden die siRNAs sequenzspezifisch durch Hybridisierung an die Ziel-mRNA und bringen so den RISC-Komplex mit seinen RNA-Helicase- und Nuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe. Es erfolgt die Entwindung und Spaltung der Ziel-mRNA, die daraufhin durch ihre jetzt ungeschützten Enden rasch durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut wird. Der RISC-Komplex kann wiederum an eine neue Ziel-mRNA binden, entfaltet also eine katalytische Aktivität. Den zur Ziel-mRNA komplementären siRNAs, die nach bestimmten Auswahlregeln abgeleitet werden können, kommt damit eine zentrale Rolle bei der Induktion von RNAi zu² (Abb. 1).

Innovate!



INNOVATION @ WORK

with Sigma, the new leader in RNAi innovate with our workflow solutions

Innovation is at the core of scientific advancement. By becoming the only fully licensed provider of both siRNA and shRNA reagents for RNAi, we at Sigma are facilitating such advancement. Allow us to show you how our extensive product offering can enable innovation at every step of your workflow.

Sigma is committed to help you innovate.

- Principle collaborator and member of The RNAi Consortium (TRC) for global distribution of pre-cloned MISSION™ shRNA libraries and future advancements in RNAi
- State-of-the-art siRNA manufacturing capabilities at Sigma Proligo
- Partnerships with key patent holders providing access to major RNAi technologies including lentiviral shRNA delivery
- Comprehensive upstream and downstream workflow solutions

Whether you are determining gene function, analyzing signal transduction or screening for potential drug targets, why not discover how Sigma's innovative approach can facilitate your breakthroughs.

sigma.com/rnai

Accelerating Customers' Success through **Leadership in Life Science, High Technology and Service**
SIGMA-ALDRICH CORPORATION • BOX 14508 • ST. LOUIS • MISSOURI 63178 • USA



Member of the RNAi Consortium

MISSION is a trademark belonging to Sigma-Aldrich Co. and its affiliate Sigma-Aldrich Biotechnology LP. The RNAi Consortium shRNA library is produced and distributed under license from the Massachusetts Institute of Technology.

SIGMA-ALDRICH®
RESEARCH BIOTECH

Zur Induktion der RNAi können siRNAs entweder als DNA-basierte Expressionssysteme (shRNAs) oder direkt als RNA-Oligonukleotide (siRNAs) in die Zelle gebracht werden.

in vivo-siRNA-Drug Delivery

Vorteile der direkten Applikation von siRNAs bestehen darin, daß sie chemisch relativ leicht synthetisiert werden können und ein geringes Gefahrenpotential aufweisen, da ihre Einschleusung nicht auf virale Systeme angewiesen ist und sie nicht in das Genom integriert werden können. Es müssen allerdings folgende Bedingungen erfüllt sein: Schutz der sehr instabilen siRNA gegen Abbau durch (Serum-) Nucleasen, effiziente zelluläre Aufnahme, keine intrazelluläre Immunstimulation und effiziente intrazelluläre siRNA-Freisetzung sowie *in vivo* geringe Toxizität und keine schnelle Elimination durch Leber oder Niere. In der Zellkultur stehen zahlreiche Transfektionsreagenzien zur Verfügung. Weit schwieriger ist die Applikation von siRNAs zu therapeutischen Zwecken *in vivo*.

Hierzu ist in den vergangenen Jahren eine größere Zahl an Studien publiziert worden, die verschiedene Strategien zur systemischen oder lokalen Applikation beschreiben. Unterscheidungsparameter sind unter anderem der Applikationsort beziehungsweise die Applikationsart, siRNA-Modifikationen und der Einsatz verschiedener Carriersysteme.

So können zur systemischen Applikation chemisch unmodifizierte siRNAs verwendet werden, deren Injektion häufig ohne weiteres Reagenz durch die sogenannte hydrodynamische Transfektion erfolgt. Während diese Methode in einigen Fällen zur effizienten Induktion von RNAi in Leber, aber auch in Lunge, Milz, Pankreas und Niere führte, ist sie für die Therapie am Menschen ungeeignet: die mehr als 1 ml, die einer Maus innerhalb we-

niger Sekunden in die Schwanzvene injiziert werden, entsprechen rund drei Litern einer intravenösen Bolus-Injektion im Menschen.

Alternative Strategien zur Applikation nackter siRNAs sind häufig auf die lokale Anwendung oder zumindest eine Applikation nahe dem Zielgewebe oder Zielorgan begrenzt. So wurden etwa intravenöse, intraperitoneale, subretinale, intrathecale, intranasale, intratracheale, intradermale, intratumorale, intraoculare oder intraventriculäre Applikationen beschrieben. Beachtet werden sollte auch, daß zahlreiche Studien relativ große Mengen siRNA (im Bereich zehn bis hundert mg/kg Körpergewicht) verwenden, was die Gefahr unspezifischer Nebenreaktionen wie einer intrazellulären Immunantwort erhöhen kann. Alternative Ansätze für die Applikation von siRNAs basieren auf ihrer Verpackung in verschiedenen, teilweise modifizierten Liposomen oder kationischen Lipiden zur systemischen oder lokalen Anwendung.

Mit gegen apoB gerichteten siRNAs in sogenannten SNALPs (stable nucleic acid lipid particles) wurde kürzlich die erste Studie in Primaten veröffentlicht. Schließlich sind eine Reihe anderer Strategien, wie beispielsweise chemische Modifikationen von siRNA-Molekülen, Elektropulsation, Virosomen, die Verwendung von Polyaminen, anderer basischer Komplexe oder Atelocollagen zur Komplexbildung, sowie die Kopplung an bestimmte Protein-Präparationen oder niedermolekulare Verbindungen beschrieben worden (vgl. Tab. 1). Obwohl die Entwicklung von auf siRNAs basierenden Therapeutika erst vor wenigen Jahren begonnen wurde, haben erste Phase I-Studien bereits begonnen oder sind bereits abgeschlossen. Acuity Pharmaceuticals (Philadelphia, USA) testeten erfolgreich eine gegen VEGF gerichtete siRNA bei der feuchten Form der Altersblindheit (Altersabhängige Maculadegeneration AMD), von der in Deutschland etwa 490.000 Personen betroffen sind; auch Alnylam (Respiratory Syncytial Virus, RSV) und die von Merck Inc. Ende Oktober akquirierte Sirna (AMD) haben Phase I-Studien initiiert.

Polyethylenimin-Komplexierung

Polyethylenimine (PEIs) sind synthetische Polymere, die linear oder verzweigt in einem breiten Molekulargewichtsbereich von <1000 Da bis >1000 kDa vorliegen können. Aufgrund einer protonierbaren Stickstoffgruppe in jeder dritten Position besitzen sie eine hohe, vom pH-Wert abhängige, aber bereits unter physiologischen Bedingungen kationische Ladungsdichte. Daher sind sie in der Lage, negativ geladene DNAs nicht-kovalent zu komplexieren. Da die so gebildeten kompakten kolloidalen Partikel von Zellen über verschiedene Endozytosewege aufgenommen werden können, wurde PEI zunächst als *in vitro*-DNA-Transfektionsreagenz eingeführt^{3,4}. Dem Mischungsverhältnis zwischen Stickstoffatomen

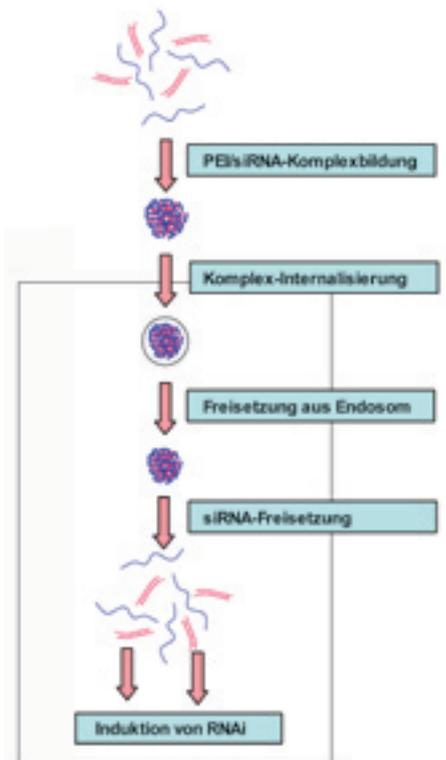


Abb. 2: Einschleusen von siRNA-Molekülen durch Polyethylenimin (PEI)-Komplexierung. Negativ geladene siRNAs (rot) und positiv geladenes PEI (blau) bilden einen nicht-kovalenten Komplex, der über Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort – vermutlich aufgrund des „Protonenschwamm-Effektes“ – aus dem Endosom wieder freigesetzt wird. Die siRNA kann nach Zerfall des Komplexes in RISC eingebaut werden und RNAi induzieren.

des PEI und Phosphoratomen der DNA (sog. N/P-Verhältnis) sowie der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad des PEI kommen dabei im Hinblick auf Größe und Ladung des Komplexes sowie der Transfektionseffizienz entscheidende Bedeutung zu.

Vermutlich kommt es nach Endozytose intrazellulär in den Endosomen/Lysosomen durch die Protonenakzeptorfunktion des PEI an den noch nicht protonierten Stickstoffatomen zu einem „Protonenschwamm-Effekt“, der zum Abpuffern des sauren pH-Wertes in diesen Kompartimenten sowie zum osmotisch bedingten Platzen der Endosomen/Lysosomen unter intrazellulärer Freisetzung der Komplexe führt.

In neueren Studien wurden Polyethylenimin-basierte Systeme für das Einschleusen kleiner RNA-Moleküle wie siRNAs etabliert⁵⁻⁷ (Abb. 2). Während chemisch nicht-modifizierte siRNAs vergleichsweise rasch degradiert werden und im Serum nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzen, sind sie nach PEI-Komplexierung über Stunden hinweg fast vollständig gegen enzymatischen oder

Tab. 1: Applikationsformen von siRNAs zur Induktion von RNAi *in vivo*

Applikationsform
Nackte siRNA
Liposomen
Lipoplexe
Kationische Lipide
Virosomen + kationische Lipide
Polyamine
Chemische Modifikationen
Chemische Modifikationen + Lipid-Einkapselung
Elektropulsation
Histidin-Lysin-Komplexe
Atelocollagen-Komplexierung
Inaktivierte HVJ-Suspension
Kopplung an Protamin-Antikörper-Fusionsprotein
Kopplung an Cholesterin
Nanoplexe
Polyethylenimin-Komplexe



Setting a NEW Standard for siRNA

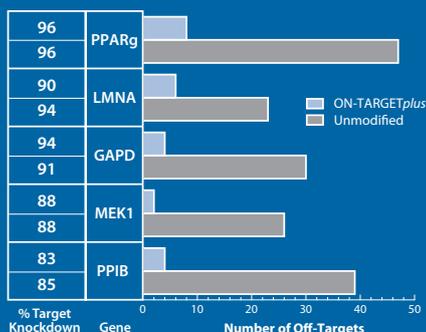
up to 90% reduction in off-target effects

ON-TARGET^{plus}™ siRNA Reagents



DHARMACON
RNA TECHNOLOGIES

Dharmacon®, the scientific leader in RNAi technologies, introduces a critical breakthrough in siRNA. **ON-TARGET^{plus} siRNA reagents** have significantly increased specificity, improving gene knockdown and greatly reducing off-target effects, resulting in superior accuracy and efficiency in your workflow.



Achieve Total Confidence in Your RNAi Results

ON-TARGET^{plus} siRNA reagents significantly reduce off-target effects while achieving potent target gene knockdown. Both ON-TARGET^{plus} and unmodified SMARTpool® siRNA reagents (100 nM) were transfected into HEK293 cells using DharmaFECT® 1 and analyzed for target gene knockdown and off-target signature.



www.perbio.com

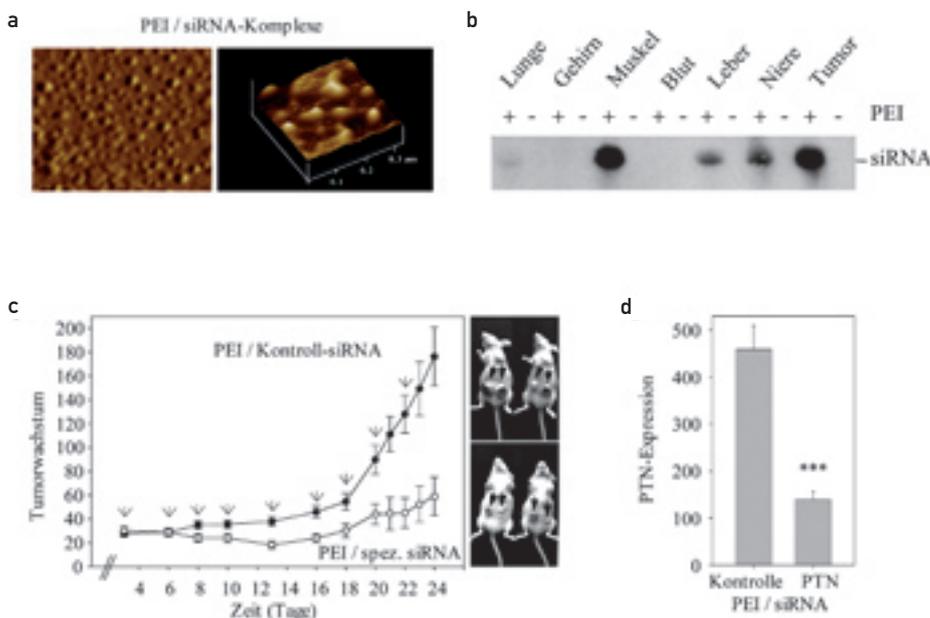


Abb. 3: Anwendung von PEI/siRNA-Komplexen als anti-tumoraler Wirkstoff *in vivo*.^{5,6} (a) Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme zeigt homogene PEI/siRNA-Komplexe, in denen die siRNA vollständig geschützt ist. (b) Systemische Applikation von PEI-komplexierter (+) bzw. nackter (-) siRNA, die hier zur besseren Detektion ³²P-markiert ist, in Mäuse mit subkutanen Tumor-Xenotransplantaten. Es wird in verschiedenen Geweben und vor allem auch im Tumor intakte siRNA nachgewiesen. (c) Durch Behandlung (Pfeile) von tumortragenden Mäusen mit PEI-komplexierter, gegen den tumorrelevanten Wachstumsfaktor Pleiotrophin (PTN) gerichteter siRNA wird ein signifikanter anti-tumorigener Effekt beobachtet. (d) Dieser ist auf die spezifische Reduktion von PTN in den Tumoren zurückzuführen.

nicht-enzymatischen Abbau geschützt. Ein auf radioaktiv markierter siRNA beruhender Assay zeigt, daß selbst die Behandlung mit RNase A nicht zu einem Abbau der siRNAs führt. In Übereinstimmung damit zeigen rasterkraftmikroskopische Aufnahmen, daß die siRNA-Moleküle tatsächlich vollständig von PEI umschlossen und damit geschützt sind (Abb. 3a). Während dies für alle PEIs zuzutreffen scheint, wird nur bei bestimmten niedermolekularen PEIs eine hinreichend hohe siRNA-Transfektionseffizienz beobachtet, also zelluläre Aufnahme der Komplexe und intrazelluläre Freisetzung der siRNAs. Hierzu gehören u.a. das kommerziell erhältlich jetPEI (Biomol) sowie das kürzlich beschriebene, 5 bis 10 kDa kleine PEI F25-LMW. In diesem Fall können die PEI/siRNA-Komplexe auch lyophilisiert und damit dauerhaft gelagert werden⁷. Obwohl die PEI-vermittelte siRNA-Transfektion nur transient ist, wurden stabile Gantargeting-Effekte für mindestens sieben Tage beobachtet.

Vor allem erlaubt die PEI-Komplexierung von siRNAs jedoch deren Anwendung *in vivo*. In mehreren Studien wurde gezeigt, daß PEI/siRNA-Komplexe systemisch appliziert werden können und Gantargeting-Effekte zeigen. So konnte nach intravenöser Injektion von PEI-komplexierten siRNAs die Produktion von Influenza A-Viren in der Lunge infizierter Mäuse reduziert werden; in einer anderen Studie waren Mäuse nach Behandlung mit PEI-komplexierten Ebola-spezifischen

siRNAs gegen eine nachfolgende tödliche Infektion partiell geschützt. Viele Studien wurden in Mausmodellen mit subkutanen Tumorexplantaten aus Zelllinien verschiedener Tumorentitäten (u.a. Glioblastom, Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom) durchgeführt. Sie beinhalteten die Inhibition der Expression verschiedener tumorrelevanter Gene wie der Rezeptoren HER-2 (c-erbB2/neu) und VEGF-R2, der Wachstumsfaktoren Pleiotrophin (PTN) und Vascular Epithelial Growth Factor (VEGF) sowie dem Fibroblast Growth Factor-Binding Protein (FGF-BP). Nach Applikation PEI-komplexierter spezifischer siRNAs wurden jeweils signifikante antitumorigene Effekte beobachtet (Abb. 3c), die auf die Reduktion des jeweiligen Genproduktes auf mRNA- und auf Proteinebene (Abb. 3d) zurückzuführen waren. Injektionen wurden alle im Sinne einer systemischen und klinisch relevanten Applikation intravenös, intraperitoneal oder subkutan, jedoch nicht intratumoral vorgenommen. Die Mengen waren mit 10 µg siRNA/Injektion deutlich geringer als in vielen Vergleichsstudien. Bioverteilungsstudien mit radioaktiv markierter siRNA belegten ferner, daß intakte siRNA-Moleküle tatsächlich in das Tumorgewebe aufgenommen werden (Abb. 3b). In einem orthotopen Glioblastom-Mausmodell wurde ferner die intrathekale Applikation von 2 µg PEI-komplexierter siRNA getestet und führte gleichfalls zu signifikanten antitumorigenen Effekten. In keinem Fall gab es Hinweise auf

Toxizität oder unspezifische, beispielsweise immunstimulierende Effekte der Komplexe oder der applizierten siRNAs.

Zur Erhöhung der Biokompatibilität und Gewebespezifität und/oder intrazellulären Freisetzung wurden in zahlreichen Studien derivatisierte PEIs beschrieben. Die Kopplung mit Polyethylenglykol (=PEGylierung) führt unter anderem zu verminderter unspezifischer Adsorption der Komplexe an Proteine und allgemein zu veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften, die wiederum von der PEG-Kettenlänge und dem PEGylierungsgrad mit bestimmt werden. Ebenso wird durch PEGylierung die Komplexstabilität von PEI/siRNA-Komplexen beeinflusst, was zu verminderter Schutz der siRNA, aber auch zu verbesserter intrazellulärer Freisetzung führen kann⁸. Die Kopplung mit gewebespezifischen Liganden wie Antikörpern, kleinen Peptiden oder Wachstumsfaktoren kann zur selektiveren Aufnahme solcher Komplexe in den jeweiligen Zielgeweben führen.

Fazit

Die Verwendung von siRNAs bietet eine leistungsfähige und sichere Methode zur Induktion von RNAi, und zahlreiche Studien beschreiben Formulierungen, die die *in vivo*-Applikation von siRNAs gestatten. Polyethylenimine stellen hier eine gute Möglichkeit dar, da sie den Schutz, die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Freisetzung von siRNAs gewährleisten, eine geringe Toxizität zeigen und durch chemische Modifikationen weiter verfeinert werden können. Ziel sind damit doppelspezifische Präparate, die hohe Gewebespezifität beim siRNA-Einschleusen mit hoher Zielgen-Spezifität der siRNA verbinden und so neue therapeutische Optionen eröffnen.

Literatur

- 1) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. *Nature* 391 (1998), 806–11.
- 2) Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. *Nature* 411 (2001), 494–8.
- 3) Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), 7297–301.
- 4) von Gersdorff, K., Sanders, N.N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S.C., Wagner, E., Ogris, M. *Mol Ther* 14 (2006), 745–53.
- 5) Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharheid, S., Czubyko, F., Aigner, A. *Gene Ther* 12 (2005), 461–6.
- 6) Grzelinski, M., Urban-Klein, B., Martens, T., Lamszus, K., Bakowsky, U., Hobel, S., Czubyko, F., Aigner, A. *Hum Gene Ther* 17 (2006), 751–66.
- 7) Werth, S., Urban-Klein, B., Dai, L., Hobel, S., Grzelinski, M., Bakowsky, U., Czubyko, F., Aigner, A. *J Control Release* 112 (2006), 257–70.
- 8) Mao, S., Neu, M., Germershaus, O., Merkel, O., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Kissel, T. *Bioconj. Chem.* 17 (2006), 1209–1218.

Korrespondenzadresse

HD Dr. Achim Aigner
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie
 Philipps-Universität Marburg
 Tel./Fax: +49-(0)6421-2862262/-2865600
 eMail: aigner@staff.uni-marburg.de

Mausmodelle

Targetvalidierung *in vivo*

Dr. Jost Seibler, Prof. Dr. Frieder Schwenk, Artemis Pharmaceuticals GmbH, Köln

RNAi zur Identifizierung und Validierung von Targetgenen in Zellen hat in jüngerer Zeit eine breite industrielle Anwendung gefunden. In zunehmendem Maß gewinnt auch die *in vivo*-Validierung für die Medikamentenentwicklung an Bedeutung. Daher wurde bei Artemis eine Technologiebasis etabliert, die eine breite Nutzung von Mäusen zur Targetvalidierung erlaubt. Artemis führt *in vivo*-'Knock-down'-Studien für pharmazeutische und akademische Partner im hohen Durchsatz durch. Dadurch können erstmals Targets *in vivo* in einem Durchsatz validiert werden, wie dies bisher nur *in vitro* durch Zellkulturexperimente erreicht werden konnte.

Die Arzneimittelindustrie leidet weltweit unter einem Innovationsdefizit: die Zahl der pro Zeiteinheit neu zugelassenen Arzneimittel mit sehr großen Umsatzpotential (Blockbuster) stagniert seit Jahren, obwohl die industriellen Forschungs- und Entwicklungsaufwendungen kontinuierlich stiegen. Um diesem Problem zu begegnen, setzt die

Prozesses *in vitro* und *in vivo* genutzt. Als eine der leistungsfähigsten Methoden auf dem Gebiet der Functional Genomics gilt das Stummschalten von Genen (Gene-Silencing) mittels RNAi *in vitro*, also in Zellkultursystemen in Verbindung mit einer anschließenden Analyse der daraus resultierenden Effekte. Es ist mittlerweile das Verfahren der Wahl für

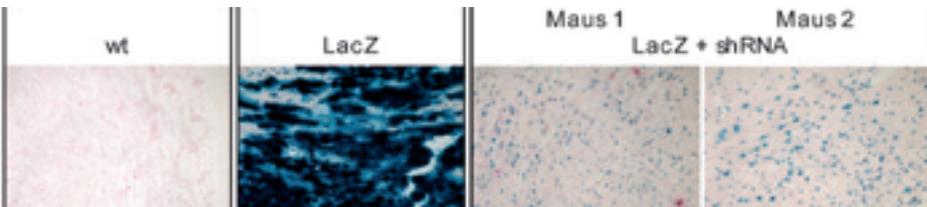


Abb. 1: 'knockdown' von LacZ als Reporter gen im Herzmuskel. Dargestellt sind Schnitte des Herzmuskels, die nach der Fixierung mit X-Gal gefärbt worden sind. wt: Wildtyp, LacZ: Negativ-Kontrolle ohne shRNA, Maus 1 + 2: LacZ + shRNA

Pharmaindustrie vor allem auf neuartige wissenschaftliche Methoden, die die Effizienz des Pharmaentwicklungsprozesses steigern können. Diese werden meist in akademischen Forschungslabors oder Biotech-Firmen zur Anwendungsreife gebracht, um dann von den Pharmafirmen, etwa über strategische Allianzen, mit den Biotech-Unternehmen in die industrielle Forschung implementiert zu werden. Entscheidend für den Erfolg der Pharmainnovation ist dabei die Targetvalidierung. Diese eröffnet die Auswahl besonders vielversprechender Screening- oder Wirkstofftargets. So kann insbesondere die Zahl der Wirkstoffe verringert werden, die während der klinischen Entwicklung abgesetzt werden müssen und daher hohe Kosten verursachen, ohne zu einem Produkt zu führen.

Das Verstummen der Gene

Für derartige Validierungen nehmen die Methoden der RNA-Interferenz (RNAi), die seit etwa 2001 in der industriellen Forschung der Arzneimittelkonzerne und der Biotechfirmen ständig an Bedeutung gewonnen haben, einen wichtigen Platz ein. RNAi wird zur Targetvalidierung für alle Stufen des F&E-

die Funktionsanalyse von Screening- und Wirkstoff-Targets. Die beiden meistgenutzten Methoden zum Gene-Silencing in Zellen sind der Einsatz von kurzen, chemisch synthetisch hergestellten doppelsträngigen RNA-Molekülen (siRNAs) und die Expression von short hairpin RNA (shRNA)-Molekülen nach Transfektion der Zellen mit Hilfe von Plasmiden oder viralen Vektoren.

Von der Knock-out- zur Knock-down-Maus

Bei den genetisch manipulierbaren Modellorganismen nimmt die Labormaus (*Mus musculus*) eine herausragende Rolle in Studien von humanen Erkrankungen und der präklinischen Arzneimittelentwicklung ein. Neben der großen Homologie der murinen und menschlichen Genome und Ähnlichkeiten in vielen physiologischen Aspekten lassen die vielfältigen Möglichkeiten zur Manipulation des Genoms die Maus als idealen Modellorganismus für die Pharmaforschung erscheinen. Seit den späten achtziger Jahren wurde die ge-

NucleoSpin® RNA/Protein Gene expression profiling



Parallel isolation of RNA and Protein from one lysate

MEDICA 2006 · Hall 03 · Booth A 58

www.mn-net.com
MACHERY-NAGEL

MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Germany



Germany
and international:
Tel.: +49 (0) 24 21 969 270
e-mail: tech-bio@mn-net.com

France:
MACHERY-NAGEL EURL
Tel.: +33 (0) 3 88 68 22 68
e-mail: sales-fr@mn-net.com

Switzerland:
MACHERY-NAGEL AG
Tel.: +41 (0) 62 388 55 00
e-mail: sales-ch@mn-net.com

Kennziffer 15 LW 06 · www.biocom.de

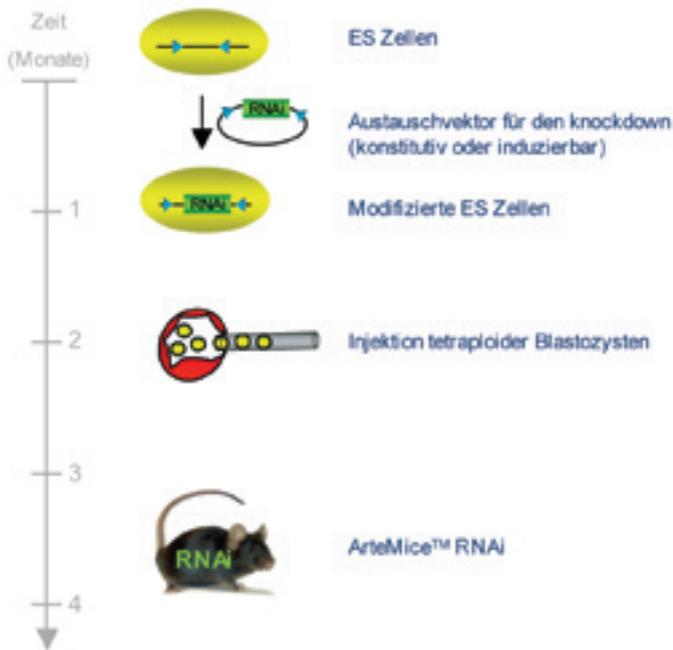


Abb. 2: Generierung von Mausmutanten mittels der Technologiebasis von Artemis. Schematisch ist die Kombination des Kassettenaustausches in embryonalen Stammzellen und der Komplementation tetraploider Blastocysten dargestellt. Fünf Wochen alte Mäuse können innerhalb von drei bis vier Monaten generiert werden.

zielte Manipulation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) genutzt, um genetisch modifizierte Mausstämme zu generieren. Zunächst wurden Gene durch die Insertion eines Markergens in die Keimbahn inaktiviert. Der größte Teil der rund 3.000 beschriebenen Knock-out-Mäuse basiert auf diesem Vorgehen. Da die Tiere eine homozygote Inaktivierung eines bestimmten Gens aufweisen, sind sie ein geeignetes Modell für Erbkrankheiten, führen aber in rund 30% der Fälle zu embryonaler oder postnataler Mortalität. Zudem eignen sich die Mäuse nicht für die Validierung von Arzneimitteltargets

und die Untersuchung anderer Fragestellungen in adulten Mäusen. Eine verbesserte Strategie stellt die konditionale Mutagenese dar, die die Inaktivierung von Genen in einem bestimmten Organ und zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt. Die konditionale Mutagenese wurde 1997 von dem Artemis-Gründer und -Berater Klaus Rajewsky (Harvard Medical School, Boston, USA) entwickelt. Artemis hat diese Methoden optimiert und für den industriellen Einsatz angepaßt¹. Auf diese Weise sind mehrere hundert Mausmodelle für Artemis-Kunden entwickelt worden.

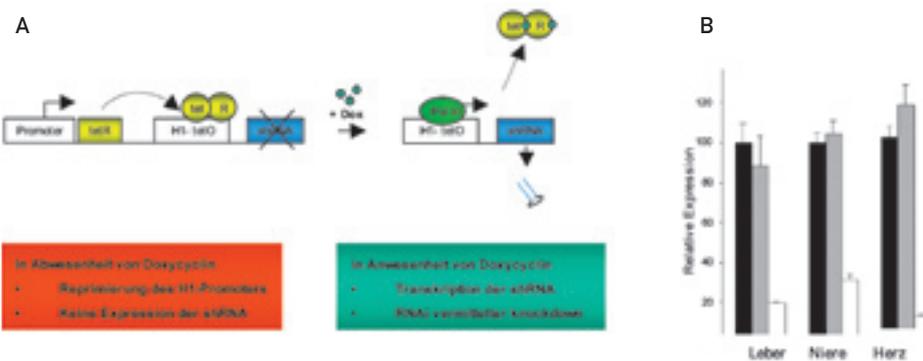


Abb. 3: Schema des *tet*-Repressor-Systems und die Effizienz des Knock-downs *in vivo*. A. Durch die Bindung des *tet*-Repressors wird die Polymerase III sterisch an der Transkription der shRNA gehemmt. Nach der Administration von Doxycyclin fällt der *tet*-Repressor von der *tet*-Operator-Bindungsstelle ab, und die Expression der shRNA führt zum Knock-down des Targetgens. B. Effizienz des Knock-downs der Firefly-Luciferase in verschiedenen Geweben der Maus. Es wurden zwei bis vier Mäuse in einem Alter von 8-10 Wochen analysiert. Die Reprimierung der Firefly-Luciferase ist prozentual dargestellt: für die nicht-induzierten Kontrollen als graue Balken und nach 10tägiger Induktion mit 2 mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser als weiße Balken. Als Negativkontrollen dienten Tiere die keine shRNA gegen die Firefly-Luciferase, aber das Targetgen exprimieren (schwarze Balken). Die relativen Werte der Firefly-Luciferase-Expression wurde mit Hilfe der *Renilla*-Luciferase als Referenzen kalkuliert.

Neue, RNAi-basierte Methoden müssen sich direkt mit den Vorteilen der bestehenden Technologien der konditionalen Mutagenese messen. Eine enorm wichtige Aufgabe in der Technologieentwicklung ist die Etablierung zuverlässiger und breit einsetzbarer Methoden für die RNAi-vermittelte Targetvalidierung *in vivo*. Dabei muß die RNAi gegenüber bisherigen Knock-out-Verfahren Vorteile bezüglich Zeitersparnis, Durchsatz, Kosten und Anwendungsvielfalt aufweisen, um am Markt zu bestehen. Die Erfolge in *in vivo*-Anwendungen waren bisher jedoch noch begrenzt: die lokale und systemische Verabreichung von siRNA-Agenzien wird unter anderem durch den Einfluß pharmakokinetischer Parameter kompliziert. An einer Optimierung, etwa der chemischen Struktur und Formulierung, wird derzeit daher intensiv gearbeitet.

Eine leistungsfähige Alternative bietet die Expression von shRNAs, bestehend aus kurzen invertierten Sequenzabschnitten, die durch einen Spacer getrennt sind. Diese erlauben im Gegensatz zur Applikation von siRNAs eine dauerhafte Inaktivierung von Genen. Zur Ausprägung dieser shRNAs werden RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren wie U6 und H1 verwendet, die besonders kurze Transkripte erzeugen. Exprimierte shRNAs werden in der Zelle zu aktiven siRNAs prozessiert. Mit dieser Technologie lassen sich in Zellkultur RNAi-Effizienzen von mehr als 80% erreichen. Daher verspricht diese Technologie ein großes Potential für die Anwendung in der Maus. Außerdem muß gegenüber der Knock-out-Technologie nur ein einzelnes Transgen in das Genom eingebracht werden, und der Aufwand bei der Herstellung der Vektoren ist deutlich geringer. Die Herausforderung bestand für Artemis in der Etablierung geeigneter Methoden für die Maus, die die Expression der shRNA in allen Geweben ermöglichen.

In den letzten Jahren wurden mehrere shRNA-basierte, transgene Mausmodelle beschrieben. Diese wurden mit Hilfe von Technologien, wie der Pronukleusinjektion, der Transfektion von Plasmiden oder der lentiviralen Integration generiert, die alle zu einer zufälligen Integration der Transgene in das Genom führen. Abhängig von der Integrationsstelle variierte die Stärke des Knock-downs (position effect variegation). Daher mußte sich an die Generierung der shRNA-transgenen Mäuse eine zeit- und arbeitsaufwendige Charakterisierung verschiedener Mauslinien anschließen, was eine routinemäßige Anwendung im hohen Durchsatz vereiteln würde. Um diese Komplikationen zu vermeiden, wurden bei Artemis Anstrengungen zur Identifikation einer genomischen Integrationsstelle unternommen, die eine definierte und reproduzierbare Ausprägung der shRNA in allen Geweben der Maus erlaubt. Hierzu wurde das *rosa26*-Gen gewählt, da es in jeder Zelle und während der gesamten Entwicklung der Maus ausgeprägt wird². Diese Eigenschaft ließ den *rosa26*-Integrationsort viel-

versprechend erscheinen. Unsere Erwartungen bestätigten sich, da eine einzelne shRNA-Kopie in diesem Locus zu einer hohen RNAi-Effizienz zwischen 80% und 95% in nahezu allen Organen führt (Abb. 1)¹.

Um zudem eine schnelle Generierung der shRNA-Mausmodelle zu erreichen, wurde ein Kassettenaustauschsystem für den rosa26-Locus in ES-Zellen entwickelt, das die effiziente Einschleusung von shRNA-Vektoren mittels genspezifischer Rekombination in einem einzigen Schritt erlaubt (Abb. 2). Die Nutzung zweier inkompatibler Erkennungsstellen erlaubt das Einbringen von DNA-Abschnitten in einen definierten Locus, der die gleichen Erkennungsstellen trägt. Anders als Verfahren, die nur eine einzelne Erkennungsstelle nutzen, ist das rekombinierte Produkt in Anwesenheit der Rekombinase stabil. Bisher sind nur einige erfolgreiche Beispiele für einen solchen Kassettenaustausch („recombination mediated cassette exchange“, RMCE) in ES-Zellen beschrieben worden. In diesen Experimenten kam es jedoch zur nicht vollständigen Rekombination und damit zu einer unerwünschten Konfiguration des Transgens. Außerdem variierte die Effizienz in den bisherigen RMCE-Beispielen abhängig von der Wahl der Erkennungsstellen, der Selektionsmethode und des chromosomalen Ortes. Daher mußten eine Reihe von Verbesserungen implementiert werden, um die Technologie zur Anwendungsreife zu bringen. Die Optimierung aller dieser Faktoren führte dazu, daß die RMCE-Effizienz auf mehr als 95% gesteigert werden konnte. Somit steht erstmals eine Methode zu Verfügung, die eine zielgerichtete Integration von shRNA-Vektoren in hohem Durchsatz und mit geringem Aufwand ermöglicht¹.

Bislang wurden auf diese Weise mehrere hundert shRNA-Vektoren erfolgreich in das Genom embryonaler Stammzellen eingebracht. Dies schafft die Voraussetzung für eine Hochdurchsatz-Nutzung der RNAi zur Targetvalidierung *in vivo*. Zudem führt der Einsatz der sogenannten ES-Maustechnologie zur schnellen Generierung von Mäusen aus Zellen mit shRNA-Expression. Diese Methode wurde bereits 2001 bei Artemis in Zusammenarbeit mit Rudolf Jaenisch etabliert und hat sich als äußerst robuste Technologie erwiesen³. Abbildung 2 zeigt die bei Artemis etablierte Technologieplattform zur Erzeugung derartiger Mausmutanten innerhalb von vier Monaten. Gegenüber der bisherigen Vorgehensweise bedeutet dies eine Zeitersparnis um mehr als die Hälfte.

Genfunktionsanalyse im Hochdurchsatz

Der erfolgreiche Knock-down konnte inzwischen für viele verschiedene Gene erfolgreich demonstriert werden¹ (Abb. 1). So führte zum Beispiel die Ausprägung einer Leptin-Rezeptor-spezifischen shRNA zu einer Knock-down-Effizienz von mindestens 90% in fast allen untersuchten Geweben, was eine deutliche Gewichtszunahme der Mausmodelle zur Folge hatte. Dies zeigt, daß der Phänotyp von Knock-out-Mäusen schnell und kostengünstig reproduziert werden kann. Weiterhin wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Grünenthal ein neues Schmerzmodell generiert. Auch hier konnte gezeigt werden, daß der Knock-down den entsprechenden publizierten Knock-out reproduzieren kann. Die entsprechenden Daten sind zur Publikation eingereicht.

Ein weiterer Meilenstein ist mit der Entwicklung eines induzierbaren Systems für die RNAi-Technologie bei Artemis erreicht worden. Entscheidend war es hierbei, ein effizient aktivierbares und zugleich „dichtes“ System zu etablieren. Induzierbare Technologien wiesen in der Maus oft eine unzureichende Regulation auf. Daher war es notwendig, sowohl den *tet*-Repressor als auch die induzierbaren Promotoren zu optimieren. Hierzu wurde eine spezielle Variante des Doxycyclin-abhängigen *tet*-Repressor-Systems genutzt (Abb. 3a). Nachdem verschiedene Konfigurationen des U6- und H1-Promoters in der Maus getestet worden sind, konnte eine Variante identifiziert werden, die eine optimale Charakteristik aufweist: Die Kombination war nach Fütterung mit Doxycyclin stark aktiviert, wies jedoch in Abwesenheit des Induktors keine Hintergrundaktivität auf. Hierbei war entscheidend, daß alle Elemente



Entdecken Sie die Real-Time Welt!
Starten Sie durch mit
Eurogentec qPCR & RTqPCR Kits!


EUROGENTEC
EST GROUP

info.de@eurogentec.com

für die induzierbare Konfiguration in einer Kassette eingebaut werden können. Damit eignet sich das System für die Herstellung induzierbarer Mausmodelle in einem einzigen Schritt.

Die beschriebenen Beispiele zeigen, daß Erkenntnisse aus der akademischen Forschung oft erst nach aufwendiger Optimierung aller Einzelschritte in die industrielle Nutzung transferiert werden können. Diese Optimierung muß neben dem Aspekt der Zeit- und Kostensparnis auch eine breite und reproduzierbare Anwendbarkeit der Technologie ermöglichen. Artemis hat sich durch die Entwicklung ihrer Technologiebasis in die Lage versetzt, ihren pharmazeutischen Partnern maßgeschneiderte Modelle für die Pharmaentwicklung anzubieten. Durch ihre RNAi-Technologie kann Artemis erstmals Medikamenten-Targets *in vivo* in einem Durchsatz validieren, wie dies bisher nur *in vitro* durch Zellkulturexperimente erreicht werden konnte. Das große Interesse der Pharmaindustrie an der Artemis-Technologiebasis bestätigt diese Strategie.

Literatur

- [1] Seibler, J., Kuter-Luks, B., Kern, H., Streu, S., Plum, L., Mauer, J., Kuhn, R., Bruning, J. C. and Schwenk F. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e67.
- [2] Seibler, J., Zevnik, B., Kuter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G. et al. *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) e12.
- [3] Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M. 3rd, Yanagimachi R. and Jaenisch, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6209-6214.

Korrespondenzadresse

Dr. Jost Seibler und Prof. Dr. Frieder Schwenk
 Artemis Pharmaceuticals GmbH
 Neurather Ring 1, D-51063 Köln
 Tel.: +49-(0)221-9645342, Fax: +49-(0)221-9645321
 eMail: seibler@artemispharma.com

Eine speziesübergreifende Ressource für RNAi-Daten und klassische Phänotypen

Philip Groth und Dr. Bertram Weiss, Genomics & Bioinformatics, Schering AG, Berlin

Phänotypen sind Gegenstand intensiver biomedizinischer Forschung. Die Daten sind jedoch über viele verschiedene Ressourcen verstreut, die sich meist einer bestimmten Spezies oder Krankheit verschrieben haben. Da Phänotypen mittlerweile im Hochdurchsatz generiert werden, wächst nicht nur deren Zahl, sondern auch die Notwendigkeit, die entsprechenden Daten zu sammeln, zu ordnen und sinnvoll zu strukturieren. Zu diesem Zweck haben wir PhenomicDB – eine Genotyp/Phänotyp-Datenbank – geschaffen und frei verfügbar gemacht (www.phenomicDB.de). Hier sind Phänotypen mit den verursachenden Genen verlinkt, und Orthologiebeziehungen werden verwendet, um unerkannte Zusammenhänge über Spezies hinweg aufzuzeigen. Wir haben PhenomicDB erweitert, um quantitative und qualitative Phänotypen aus RNAi-Screens aufzunehmen. Die Integration klassischer Phänotypen (z.B. Knock-out-Mäuse) mit zellulären Phänotypen aus Hochdurchsatzscreenings (z.B. RNAi) über Artengrenzen hinweg wird unser biologisches Verständnis verbessern und diesen wertvollen Funktions-Daten die nötige Beachtung im Laboralltag bringen.

Organism name	Official gene symbol	Official gene name	NCBI Gene ID
Homo sapiens	FRAX	Frataxin	2388
Mus musculus	FRAX	Frataxin	4480
Gallus gallus	LOC10734	similar to frataxin (accession J03999)	51201

Abb. 1: Typische Ergebnisliste aus PhenomicDB für die Frataxin-Orthologiegruppe (einige Einträge wurden ausgelassen, um die Übersichtlichkeit zu verbessern). Zu jedem Gen der Frataxin-Orthologiegruppe werden eingerückt und grün unterlegt die dazugehörigen Phänotypen angezeigt. Die Hyperlinks führen zu den Quelldatenbanken, der „Show Entry“-Knopf zeigt den vollständigen Eintrag für Gen und Phänotyp. Es gibt keinen Phänotypen für *Gallus gallus*, und daher ist diese Zeile rot unterlegt [Abb. mit freundl. Genehmigung aus 4].

Phänotypen sind in der post-genomischen Ära wieder stärker ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Ohne sie ist es unmöglich, der großen Menge bioinformatisch identifizierter Gene biologische Funktionen zuzuweisen. Auch erlauben es jüngere Entwicklungen neuer Technologien wie etwa der RNA-Interferenz (RNAi)¹, experimentell (verifizierte) Phänotypen mit hohem Durchsatz zu generieren und mit den Genotypen zu assoziieren. Mittlerweile gibt es viele Ressourcen, die Phänotypdaten im genomischen Kontext vorhalten – meist fokussiert auf Organismus, Krankheit oder experimentelle Methode. Die Bedeutung der Phänotypen, die wichtigsten Datenbanken und hilfreiche Analysemethoden haben wir erst kürzlich in einem Übersichtsartikel² beschrieben. Besonders vielversprechend ist es, Phänotypen miteinander zu vergleichen (vergleichende Phänomik), um etwa Hinweise für neue Mitglieder bekannter Signal- oder Synthesewege (Pathways) oder die Funktion von Genen zu erhalten, deren Orthologie schon phänotypisch aufgefallen sind.

Spezies-übergreifende Phänotyp-Datenbanken

Bisher gab es jedoch nur wenige Ansätze, Genotypen und Phänotypen speziesübergreifend zusammenzustellen. Aus diesem Grund haben wir vor zwei Jahren in Zusammenarbeit mit der Firma Metalife PhenomicDB^{3,4} geschaffen – eine Datenbank, in der Genotypen und Phänotypen für viele verschiedene (vor allem Modell-) Organismen zusammengefasst sind. PhenomicDB ist frei und ohne Einschränkungen unter www.phenomicdb.de zugänglich. Die speziesübergreifende Suche wird durch die Einbindung von Orthologiebeziehungen zwischen den Genen ermöglicht. Da Gene in Orthologiegruppen zusammengefasst sind, werden die Informationen der Phänotypen aus verschiedenen Organismen auf einen Blick strukturiert sichtbar. PhenomicDB verfügt über phänotypische Daten aus Mutantenscreens, Knock-out- und RNA-Interferenz-Studien, aber auch Beschreibungen von Krankheiten oder natürlichen Mutanten, beispielsweise aus *Drosophila melanogaster*, sind enthalten.

Phänotypen mehrerer Spezies sind sonst nur noch in der Online Mendelian Inheritance in Animals-Datenbank (OMIA)^{2,4} zusammengefasst – einer kleinen für Haus- und Nutztiere angelegten Variante der Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)^{2,4}-Datensammlung – oder in ENSEMBL, die phänotypische high-level-Daten auch von orthologen Genen vorhält⁴. Jedoch ist PhenomicDB bis dato die einzige Datenbank, die Phänotypen detailliert für mehrere Spezies nebeneinander präsentiert. Aufgrund der

Kennziffer **17 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de

Entwicklung und Verbreitung neuer Technologien wie RNAi haben wir kürzlich die Version 2.1 herausgebracht, die nun auch Daten genomischer RNAi-Screens zusammen mit experimentellen Details, mit beschreibende Terme für Phänotypen aus der Mammalian Phenotype Ontologie, den Zelllinien und Beschreibungen der experimentellen Assays darstellt.

Das Prinzip PhenomicDB

PhenomicDB vereint Phänotypbeschreibungen aus verschiedenen Ressourcen, unter anderem aus OMIM, der Mouse Genome Database (MGD), WormBase, FlyBase, der Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD), dem Zebrafish Information Network (ZFIN), und der MIPS *Arabidopsis thaliana*-Datenbank (MAtdB)^{2,4}. Die meisten der von diesen Quellen gesammelten Phänotypen sind direkt mit den verursachenden Genen verknüpft. Dadurch können Phänotypen auf einem gemeinsamen Genindex abgebildet werden, hier dem Entrez Gene-Index des National Center for Biotechnology Information (NCBI)^{2,4}. Die HomoloGene-Datenbank des NCBI^{2,4} liefert Orthologiebeziehungen zwischen funktionell gleichen Genen unterschiedlicher Spezies bezogen auf den Entrez Gene-Index. In PhenomicDB werden diese Beziehungen genutzt, um Gene in Orthologiegruppen zusammenzufassen und so schnell zu einer Übersicht zu kommen, welche Phänotypen zu einem Gen in verschiedenen Spezies gehören. Zu den Genen werden in PhenomicDB auch die Genannotationen aus Entrez Gene inklusive der Gene Ontology aufgeführt.

Durch die Anpassung für genomische RNAi-Screens würdigt PhenomicDB deren große Bedeutung. Da diese Daten bisher oft weitverteilt in vielen kleineren Datenbanken – wie etwa Phenobank⁶ oder FlyRNAi⁷ – erschienen sind, hat sich PhenomicDB zu einer zentralen Sammelstelle für diese Daten entwickelt. PhenomicDB ermöglicht damit nicht nur den zentralen Zugriff auf die Daten einer steigenden Anzahl von RNAi-Screens, sondern stellt diese zellulären Phänotypen auch im Kontext klassischer Phänotypen wie etwa von Knock-out-Mäusen dar.

Bedienung

Die grafische Benutzeroberfläche von PhenomicDB wurde so einfach und effektiv wie möglich gestaltet. Eine Anfrage kann durch Eingabe eines Suchbegriffs (z.B. „apoptosis“, „BUB1“) oder eines Identifiers (z.B. „NM_001211“) intuitiv und ohne Vorkenntnisse gestartet werden. Die voreingestellte Ansicht auf die Daten kann nach Belieben des Nutzers umkonfiguriert werden, um etwa zusätzliche Datenfelder (wie Gensymbol, Name des Phänotypen, Ontologieterme, chromosomale Lokalisation, etc.) anzuzeigen. Suchanfragen können mit Platzhaltern ergänzt und durch logische Operanden („AND“, „NOT“, „OR“) verknüpft werden. Weiterhin kann die Suche auf bestimmte Felder, Domänen oder Organismen beschränkt werden.

Die so frei konfigurierbare Ergebnisliste (Abb. 1) gibt alle Treffer nach Genen sortiert mit den assoziierten Phänotypen – eingerückt und grün hinterlegt – wieder. Ein Knopf „Orthologies“ bei jedem Gen führt zu einer analogen Ergebnisliste, die dieses Gen mit allen seinen orthologen Genen und deren Phänotypen anzeigt. Auf allen Seiten gilt: der Knopf „Show Entry“ führt zu dem vollen Genotyp/Phänotyp-Report. Ebenso gibt es stets Verweise auf die Original-Datenbankeinträge, um eine ordnungsgemäße Referenzierung zu gewährleisten. Um extern direkt auf PhenomicDB zugreifen zu können, gibt es die Möglichkeit, statische Hyperlinks zu generieren und

Kennziffer **18 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de


Der neue **StabyCloning™** Kit

Ein hocheffizientes System zum **schnellen Klonieren** von blunt end PCR-Produkten

Klonieren in 1 Stunde sowie Minimierung des Hintergrundes!

- > Schnelligkeit
- > Präzision
- > Stabilität
- > Mobilität/Flexibilität



EUROGENTEC
EST. 2002

info.de@eurogentec.com | www.eurogentec.com

New Books

8th Guide to German Biotech

In the eighth volume of the Guide to German Biotech Companies some 100 leading dedicated biotech firms are presenting their activities to the international public. The English-language, full-colour, high-quality compendium is jointly published by the three German biotech associations BIO Deutschland, DIB and VBU.

8th Guide to German Biotech Companies
16,80 €, 2006, ISBN 3-928383-10-8
Tel. +49-30/2649 21-40, Fax +49-30/2649 21-11
service@biocom.de, www.biocom.de



BIOCOM AG

so auf einen beliebigen Phänotypen oder Genotypen zu lenken. Dynamische URLs mit Suchbegriffen verhalten sich genauso, als wäre der Begriff direkt in die Maske der Hauptseite eingegeben worden. BioBar (<http://biobar.mozdev.org/>), eine bioinformatische Browsererweiterung, erlaubt – neben vielen anderen molekularbiologischen Datenbanken – ebenfalls den direkten Zugriff auf PhenomicDB.

Inhalt der PhenomicDB

Mittlerweile beinhaltet PhenomicDB insgesamt 399.772 Phänotypen, die mit 77.400 eukaryotischen Genen assoziiert sind. Der

gefunden wurden. Für weniger als 1,5% der Phänotypen gibt es keine Verknüpfung zu einem Gen. Es gibt 40.299 Orthologiegruppen, von denen einem Drittel (13.695) ein Phänotyp in mindestens einer der zugehörigen Spezies zugeordnet werden kann. In *Homo sapiens* sind 2.850 Gene mit 4.009 humanen Phänotypen verknüpft, und für weitere 7.592 humane Gene gibt es mindestens einen „orthologen Phänotypen“. Hierdurch wird der Prozentsatz menschlicher Gene mit phänotypischer Information von 8% – das entspricht etwa dem OMIM-Datensatz – auf 31% des Genindex angehoben. In *Mus musculus* heben „orthologe Phänotypen“ diesen Prozentsatz auf mehr als 30% des Genindex

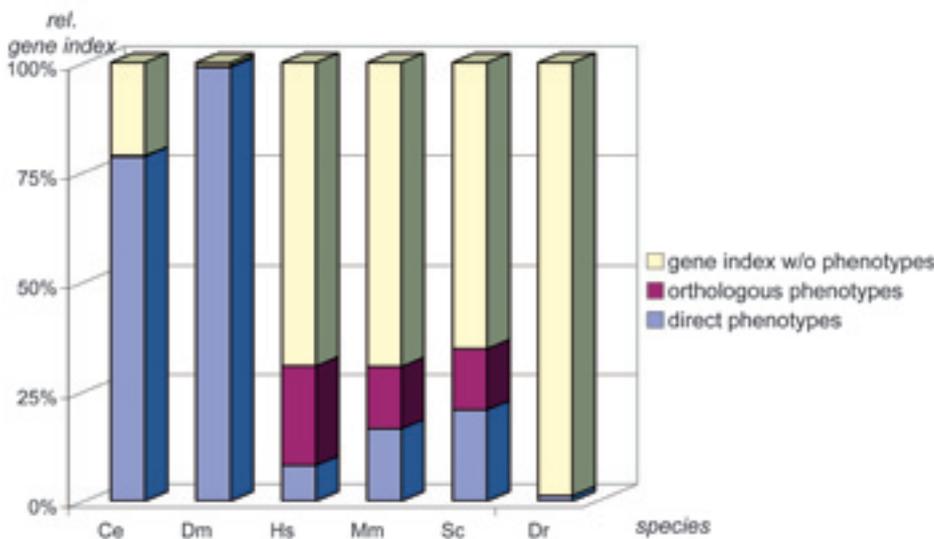


Abb. 2: Prozentsatz von Phänotypen am gesamten Entrez Gene-Index für fünf Modellorganismen und den Menschen. (Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Dr, *Danio rerio*). In blau ist die prozentuale Abdeckung des Genindex durch „direkte Phänotypen“ gezeigt. Der Prozentsatz der Gene, die nur Phänotypen für einen Orthologen aufweisen, sind rot dargestellt. Der Anteil der Gene ohne Phänotyp ist gelb markiert. Die roten Balken verdeutlichen daher den direkten Nutzen der Integration von Phänotypen mehrerer Spezies in PhenomicDB. Die hohe Abdeckung der Genindizes von *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* resultiert aus der hohen Anzahl genomweiter RNAi-Screens für diese beiden Spezies [Abb. mit freundl. Genehmigung aus 4].

prozentuale Anteil des Genindex einer Spezies, der mit Phänotypen assoziiert ist, variiert stark zwischen den Spezies: Er beträgt ungefähr 99% für *Drosophila melanogaster*, 79% für *Caenorhabditis elegans*, 21% für *Saccharomyces cerevisiae*, etwa 16% für *Mus musculus* (geschätzt auf der Basis des humanen Entrez Genindex, da der Maus-Genindex (62.907 Gene IDs) noch redundant ist) und 8% für *Homo sapiens*. 84% aller Phänotypen in PhenomicDB stammen von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, da für diese beiden Spezies die meisten genomweiten RNAi-Screens durchgeführt wurden. 16,2% der Phänotypen sind mit Genen assoziiert, für die bislang keine Orthologe

an (vgl. Abb. 2). Diese Zahlen verdeutlichen das Potential, das in der Integration unterschiedlichster phänotypischer Daten verschiedener Spezies steckt.

Ausblick

Seit ihrer Entstehung haben wir PhenomicDB sowohl funktionell als auch inhaltlich kontinuierlich weiterentwickelt. Die Einbindung von RNAi-Daten hat einen großen Zuwachs an zellulären Phänotypen gebracht, und es werden auch weiterhin Daten neuer genomweiter RNAi-Screens von uns hinzugefügt. Ebenso werden in Kürze Phänotypen aus *Dictyostelium discoideum*

und weitere aus *Saccharomyces cerevisiae* folgen. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die prozentuale Abdeckung des menschlichen Genoms mit phänotypischen Informationen kontinuierlich steigen wird. Von 2007 an wird PhenomicDB auch als Webservice sowie der gesamte Datensatz als herunterladbare XML-Datei in einem von uns neuentwickelten XML-Format zur Verfügung stehen. An neuer Funktionalität wird die nächste Version nicht nur Orthologien, sondern auch Proteininteraktionspartner als Gruppierungsmerkmal anbieten.

Fazit

PhenomicDB bietet schnellen und komfortablen Zugriff auf Phänotypdaten vieler verschiedener Spezies, setzt „klassische“ (k.o.-Mäuse, klinische Beschreibungen) mit zellulären Phänotypen (RNAi) in Beziehung und kann so helfen, die oft schwer zugänglichen Phänotypen stärker „laborfähig“ zu machen. 6.000 Zugriffe im Monat zeigen das große Interesse an diesen Daten. Das stetige Wachstum von PhenomicDB wirft die Frage nach besseren Data-mining-Methoden für Phänotypdaten auf. Derzeit arbeiten wir an unterschiedlichen Ansätzen, wie stärkere Einbindung der Ontologien oder Textclustering, um die Möglichkeiten und den Wert der Daten in PhenomicDB weiter zu steigern.

Literatur

- [1] Shi, Y. (2003) Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.* 19, 9–12.
- [2] Groth, P. and Weiss, B. (2006) Phenotype data: a neglected resource in biomedical research?. *Current Bioinformatics*, 1, 347–358.
- [3] Kahraman, A., Avramov, A., Nashev, L.G., Popov, D., Termes, R., Pohlentz, H.D. and Weiss, B. (2005) PhenomicDB: a multi-species genotype/phenotype database for comparative phenomics. *Bioinformatics*, 21, 418–420.
- [4] Groth, P., Pavlova, N., Kalev, I., Tonov, S., Georgiev, G., Pohlentz, H.-D., Weiss, B.: "PhenomicDB: A new cross-species Genotype/Phenotype Resource"; 2007 Jan 1; 34(Database issue). doi:10.1093/nar/gkl662
- [5] Smith, C.L., Goldsmith, C.A. and Eppig, J.T. (2005) The Mammalian Phenotype Ontology as a tool for annotating, analyzing and comparing phenotypic information. *Genome Biol.* 6, R7.
- [6] Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E. et al. (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434, 462–469.
- [7] Flockhart, I., Booker, M., Kiger, A., Boutros, M., Armknecht, S., Ramadan, N., Richardson, K., Xu, A., Perrimon, N. and Matthey-Prevot, B. (2006) FlyRNAi: the *Drosophila* RNAi screening center database. *Nucleic Acids Res.* 34 Database Issue, D489–494.

Teile dieses Artikels wurden in (4) von den Autoren in Zusammenarbeit mit N. Pavlova, I. Kalev, S. Tonov, G. Georgiev und H.-D. Pohlentz erstveröffentlicht.

Korrespondenzadresse

Dr. Bertram Weiss
Schering AG
Müllerstraße 178
D-13442 Berlin
Tel.: +49-30-468-14424
Fax: +49-30-468-94424
eMail: bertram.weiss@schering.de



shift into **high gear**
with new
LANCE Ultra

Ultimate Speed and Performance for TR-FRET Assays

The best TR-FRET technology just got better! Introducing LANCE® *Ultra* from PerkinElmer. It takes our proven, cost-effective LANCE technology to an even higher level of performance.

LANCE *Ultra* uses optimized *ULight*™-labeled kinase substrates and europium-labeled phospho-detection antibody reagents to speed assay development, simplify assay formats and provide superior performance:

- Uses small MW *ULight* red-shifted dye, optimized for HTS.
- Ultra-high throughput to 1M compounds per day with our ViewLux™ Multilabel Plate Imager.
- Robust and precise with typical Z' values of 0.8 or better.

Shift to better and faster TR-FRET assays for your most demanding uHTS screens with a better technology—LANCE *Ultra*.

For more information, contact your PerkinElmer Sales Representative or visit www.perkinelmer.de



For a complete listing of our global offices, visit www.perkinelmer.com/lasoffices

www.perkinelmer.com

Optimierung des siRNA-vermittelten Gene Silencing

Steve Kulisch, Teresa Esch, Christina Whitman-Guliaev und Teresa Rubio,
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein intrinsischer zellulärer Mechanismus, der in den meisten Eukaryonten konserviert ist. Er hilft, die Expression von Genen zu regulieren, die entscheidend für die Bestimmung des Zellschicksals, für Differenzierung, Überleben und Verteidigung gegen virale Infektionen sind. Forscher nutzen diesen natürlichen Mechanismus, um synthetische, Doppelstrang-RNAs (dsRNAs) für das sequenzspezifische Gene Silencing zu entwerfen und damit die Funktion des Gens aufzuklären¹⁻³. Diese Ansätze helfen dabei, schnell von der Entdeckung und Erforschung zu potentiellen therapeutischen Applikationen zu kommen⁴.

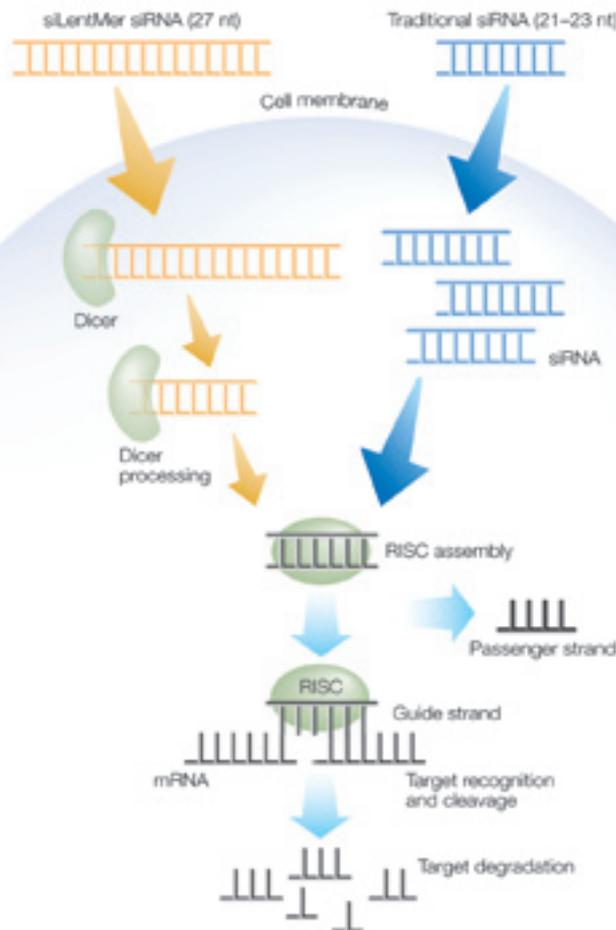


Abb. 1: Aktivierung des RNAi-Signalweges durch dsRNAs. Lange dsRNAs werden durch die Dicer-Endonuklease gespalten, um 21-23 nt-Duplexe zu bilden. Nach Spaltung werden die siRNA-Duplexe in RISC eingebaut. Die Entwindung des siRNA-Doppelstranges führt zur Retention des Führungsstranges. Dieser paart mit den komplementären mRNA-Sequenzen, die durch RISC gespalten und abgebaut werden. Dies erlaubt das Silencing eines spezifischen Gens. Dicer kann zusätzlich zur Spaltung von dsRNAs > 21 nt die Beladung von siRNAs in RISC erleichtern. Dies könnte erklären, warum synthetische 21-mer-dsRNAs, die naturgemäß nicht mehr durch Dicer gespalten werden, weniger effektiv sind als 27-merer derselben Sequenz. Da Dicer die Beladung beeinflussen kann und da die siRNA-Struktur die Orientierung der Dicer-Bindung beeinflusst, können Dicer-Substrat-siRNAs konstruiert werden, die die spezifische Spaltung durch Dicer und die bevorzugte Retention des zur Ziel-mRNA komplementären Führungsstranges fördern.

Seit dem erstmaligen Nachweis, daß 19-23 Nukleotide (nts) lange „small interfering RNAs“ (siRNAs) das genspezifische Silencing vermitteln⁵, wurde versucht, mittels siRNA-Design die Spezifität und Wirksamkeit zu verbessern und off-target-Effekte zu reduzieren⁶⁻⁸. Obgleich traditionelle synthetische siRNAs wirksam sind, die auf dem 21-23-mer-Design basieren, führte erst ein besseres Verständnis der genauen Vorgänge und Enzyme, die in den RNAi-Signalweg involviert sind, zu deutlichen Verbesserungen des Designs von siRNAs. Diese wurden dadurch noch effizientere Werkzeuge für die Induktion, Kontrolle und Interpretation von Gene Silencing-Ereignissen in der täglichen Forschung⁹⁻¹⁰. Dieser Artikel beschreibt Studien von Forschern der City of Hope und von Integrated DNA Technologies (IDT), die zur Entwicklung eines solchen Werkzeugs führte – der Dicer-Substrat siRNA – einem hochpotenten Mediator der RNA-Interferenz.

RNAi-Übersicht

Der RNAi-Signalweg ist Teil eines größeren Netzwerkes, das kleine RNA-Moleküle als Regulatoren zellulärer Signale nutzt und basiert auf dsRNA als Schalter für das sequenzspezifische Gene Silencing (Abb. 1). In diesem Signalweg assoziieren längere dsRNAs mit der Dicer-Endonuklease, einer RNase III, die die dsRNA exakt in kleinere funktionelle siRNAs schneidet¹¹. Diese siRNAs assoziieren mit dem sogenannten RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), der auf eine homologe mRNA für den Abbau abzielt. Vor kurzem wurde vorgeschlagen, daß die Dicer-Endonuklease zusätzlich zur Spaltung längerer dsRNAs auch bei der Beladung prozessierter dsRNAs in RISC und bei der Bildung von RISC selbst eine Rolle spielt¹²⁻¹⁴. Diese Hypothese half, die Entwicklung einer neuen Klasse von siRNAs voranzutreiben, den Dicer-Substrat siRNAs.

Dicer-Substrat-siRNA

Während lange (>30 nt) dsRNAs erfolgreich zur Regulation der Genexpression in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen, wie etwa von Pilzen, Pflanzen und *C. elegans*, genutzt werden konnten¹⁵⁻¹⁷, aktivierten sie bei Applikation in Säugersystemen oft intrinsische zelluläre Immunantworten, die zu einem breiten unspezifischen Abbau von mRNAs führen¹⁸⁻¹⁹. Um die Aktivierung dieser Immunantworten in RNA-Interferenz-Experimenten zu verhindern, verwenden Forscher normalerweise kürzere dsRNAs²⁰.

Neuere Studien zeigen indessen, daß dsRNAs mit einer Länge von 25-30 nt stärkere Effektoren für das genspezifische Silencing sind als 21-merer. Dabei sind 25-30-merer bis zu hundertfach potenter als 21-mer

Kennziffer 20 LW 06 · Informationen ordern? · www.biocom.de

siRNAs, die auf die gleiche Sequenz abzielen²¹. Diese Eigenschaft scheint von der Prozessierung der längeren dsRNAs durch Dicer abzuhängen, das die längeren dsRNAs schneidet, um 21-mer zu produzieren. Als 27-mer siRNAs selektiv mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) markiert wurden, um die Spaltung durch Dicer zu reduzieren, wurde eine entsprechender Rückgang in der Wirksamkeit der siRNA beobachtet²¹.

Die Spaltung von 27-meren in spezifische 21-mer durch Dicer erklärt aber nicht die größere Potenz der 27-mer. Verschiedene 21-mer-siRNAs (mit zwei Basen Überhang am 3'-Terminus) wurden synthetisiert, um verschiedensten Dicer-Produkten zu entsprechen, die aus einem 27-mer-Duplex mit glatten (Blunt-) Enden abgeleitet werden konnten. Doch keines dieser 21-mer – sowohl individuell als auch gepoolt – erreichte das mit den niedrigkonzentrierten 27-mer-siRNAs erzielte Silencing-Niveau²¹. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Versorgung von Dicer mit einem Substrat zur Spaltung (zum Beispiel einem 27-mer) die Effizienz für die zweite Rolle von Dicer – der Einführung von siRNAs in RISC – verbessert und daß dies verantwortlich für das verbesserte Silencing durch 27-mer ist¹³.

Asymmetrisches Design von 27-meren verleiht funktionelle Polarität

In nachfolgenden Arbeiten an Dicer-Substrat-siRNAs wurde versucht, das Design weiter zu optimieren, um auf diesem Wege die Silencing-Effizienz zu verbessern¹³. Allgemeine Regeln für das siRNA-Duplex-Design – wie Länge, Sequenz und die sterische Zugänglichkeit zum Target – spielen eine Rolle in der relativen Wirksamkeit jeder siRNA²²⁻²⁴. Zusätzlich zu diesen Regeln können Dicer-Substrat-siRNAs konstruiert werden, die die Spaltung durch Dicer an einer spezifischen Position fördern und so gezielt das wirksamste 21-mer-Produkt erzeugen. Weiteres geschicktes Design kann die Dynamik des Strangeinbaus in RISC beeinflussen, was die selektive Retention des Führungsstranges – also des Antisense-Stranges, der komplementär zur Ziel-mRNA ist – fördert und die Leistungsfähigkeit von siRNAs *in vitro* deutlich erhöht.

Durch den Einsatz der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) zur Analyse verschiedener Dicer-Produkte, die sich von 27-meren ableiten, gelang es Forschern bei IDT und City of Hope, strukturelle Eigenschaften zu identifizieren, die die Herstellung eines definierten, vorhersagbaren und maximal aktiven Produktes ermöglichen¹³. Besonders ein asymmetrisches Design – mit einem 3'-terminalen Zwei-Basen-Überhang an dem einen Strang und der Addition von zwei DNA-Resten am 3'-Ende des anderen Stranges (Abb. 2) – wirkt der Heterogenität des gespaltenen siRNA-Produktes stark entgegen: Das stumpfe Ende ist unvorteilhaft für die Dicer-Bindung, und die Spaltung erfolgt bevorzugt 21 bis 22 Basen entfernt vom Überhang. Maximale Wirksamkeit wird schließlich erreicht, wenn sich der Zwei-Basen-Überhang auf dem Antisense-Strang befindet und die DNA-Basen an den Sense-Strang angefügt werden. In diesem Fall bindet Dicer an das 5'-Ende des Antisense-Stranges, was eine bevorzugte Retention dieses Stranges in RISC bewirkt. Diese Designmerkmale, die in Bio-Rads siLentMer Dicer-substrate-siRNAs verwirklicht sind, stellen die maximale Wirksamkeit bei RNAi-Experimenten sicher.

Nutzen von Dicer-Substrat-siRNAs

Um die RNA-Interferenz in Forschung und Arzneimittelentwicklung effektiv nutzen zu können, müssen unspezifische Effekte

Kennziffer 21 LW 06 · Informationen ordern? · www.biocom.de



Treiben Sie Ihre Forschung voran Antikörper von Eurogentec !

- Polyklonale Antikörper
 - Anti-Protein Antikörper
 - Anti-Peptid Antikörper
 - Erfolgsrezept DoubleX-Programm
 - Phosphopeptid-spezifische Antikörper
- Monoklonale Antikörper
- Zusätzliche Serviceleistungen
 - Peptidsynthese, ELISA-Tests,
 - Aufreinigungen, Markierungen
- Unverbindliche Beratung



info.de@eurogentec.com

KURSBUCH BIOPOLITIK Vol. 3

mit Beiträgen von:



Rainer Beckmann
Franz-Josef Bormann
Roger J. Busch
Thomas Deichmann
Wolf R. Dombrowsky
Renata Ch. Feldmann
Volker Gerhardt
Susanne Glasmacher
Wolfram Henn
Aloys Hüttermann
Regine Kollek
Tanja Kronen
Reinhard Kurth
Johannes Löwer
Herbert Martin
Gerd Richter
René Röspel
Jürgen Rüttgers
Karl-Friedrich Sewing
Ulrich Storz

ISBN 3-928383-24-8

208 Seiten, 24,80 €

Erhältlich im Buchhandel bzw. unter:

Tel.: 030/264921-40 oder www.biocom.de

BIOCUM AG

minimiert werden. Unspezifische Effekte können durch Sequenzhomologien einer ungerichteten mRNA bedingt sein oder von der Aktivierung zellulärer Antworten herühren – besonders von der Induktion der Interferonantwort, die durch umfassenden Translationsarrest induziert werden kann. Darüber hinaus weisen einige Daten darauf hin, daß die RNAi-Maschinerie gesättigt werden kann und so die genaue Prozessierung von microRNAs (miRNA)²⁵ inhibiert, was zu Toxizität führt.

Unspezifische Effekte sowie die Toxizität lassen sich dadurch begrenzen, daß niedrige siRNA-Konzentrationen eingesetzt werden. Während sich zum Beispiel die volle Aktivierung des Interferon-Signalwegs durch die mäßige Verwendung von siRNAs <30

kann das Risiko der Interferon-vermittelten off-Target-Effekte also durch den Einsatz von Reagenzien verringert werden, die niedrige, nanomolare Konzentrationen von siRNA erlauben²⁶.

Ein weiterer Nutzen von Dicer-Substrat-siRNAs ist die Dauerhaftigkeit des Silencings. Als NIH-3T3-Zellen, die das enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) stabil exprimieren, mit 21-meren oder 27-meren gegen eine identische Target-Sequenz transfiziert wurden, hielt das eGFP-Silencing durch das 21-mer etwa vier Tage lang an. Das Silencing durch das 27-mer dauerte aber bis zu 10 Tage an²⁷. Diese Resultate passen zu Beobachtungen anderer Studien²⁶. Auch bestimmte 21-mer-siRNAs – sogenannte hyperfunktionelle siRNA – können



Abb. 2: 27-mer Dicer-Substrat-siRNA. Die funktionelle siRNA wird mit einem 25 Basen langen Sense-Strang und einem 27 Basen langen Antisense-Strang konstruiert. Ein zwei Basen langes DNA-Paar wird am 3'-Ende angehängt, um ein stumpfes Ende zu schaffen, das die Dicer-vermittelte Prozessierung lenkt, um eine vorhersagbare, funktionelle siRNA zu erhalten.

nt Länge vermeiden läßt⁵, können proinflammatorische Antworten durch höhere Konzentrationen von siRNA aktiviert werden²⁶. Wenn Dicer-Substrat-siRNAs mit einem effizienten Transfektionsreagenz und -protokoll eingesetzt werden, sind sie bereits bei einer Konzentration von 100 pM wirksam. Dies minimiert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von off-target-Effekten. Um die potentielle Aktivierung von Immunantworten zu reduzieren, können Dicer-Substrat-siRNAs spezifisch darauf zugeschnitten werden, die Aktivierung proinflammatorischer Cytokine wie Interferon (IFN)- α und IFN- β sowie des Proteinkinase R (PKR)-Signalwegs zu verhindern²⁷.

Um diesen Effekt zu belegen, wurden Zellen mit einer 27-mer-dsRNA, einer 21-mer-siRNA oder einer Triphosphat-enthaltenden Einzelstrang-RNA (ssRNA) transfiziert. Die ssRNA wurde als Positivkontrolle eingesetzt, sie bewirkt nach Transfektion hocheffizient die Aktivierung von IFN- α und IFN- β . Verglichen mit Zellen, die mit ssRNA transfiziert wurden, zeigten Assays von Zellysaten aus mit 27-mer oder 21-mer siRNAs transfizierten Zellen keine nachweisbaren Mengen an IFN- α und IFN- β . Auch eine PKR-Aktivierung konnte nicht detektiert werden. Während das Risiko anderer off-target-Effekte bleibt,

ein vergleichsweise langfristiges Silencing bewirken²². Als Vorteil von 27-meren bleibt aber, daß diese von Dicer kontrolliert zu einer einzigen, wenig immunogenen siRNA prozessiert werden, die auch niedrig konzentriert dauerhaft und beständig wirkt.

Fazit

Synthetische 27-mer-Dicer-Substrat-dsRNAs können so entworfen werden, daß sie von Dicer vorhersagbar prozessiert werden und eine entsprechend orientierte Beladung in RISC sowie eine maximale RNAi-Effizienz gewährleisten. Der Einsatz einer effizienten Transfektionsmethode erlaubt es, diese siRNAs in niedrigen Konzentrationen einzusetzen und so die Möglichkeit von off-target-Effekten zu minimieren.

Literatur

[1] Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 418, 244–251 (2002)
 [2] Hutvagner G and Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225–232 (2002)
 [3] Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* 13, 139–141 (1999)
 [4] Xia H et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nature Med* 10, 816–820 (2004)
 [5] Elbashir SM et al. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188–200 (2001a)
 [6] Birmingham A et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3, 199–204 (2006)

[7] Jagla B et al. Sequence characteristics of functional siRNAs. *RNA* 11, 864–872 (2005)
 [8] Naito Y et al. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32, W124–W129 (2004)
 [9] Khvorova A et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216 (2003)
 [10] Schwarz DS et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208 (2003)
 [11] MacRae IJ et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195–198 (2006)
 [12] Lee YS et al. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81 (2004)
 [13] Rose SD et al. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 4140–4156 (2005)
 [14] Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 127–138 (2005)
 [15] Napoli C et al. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289 (1990)
 [16] Romano N and Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6, 3343–3353 (1992)
 [17] Fire A et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998)

[18] Minks MA et al. Synthesis of 2'5'-oligo(A) in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 254, 5058–5064 (1979)
 [19] Stark GR et al. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227–264 (1998)
 [20] Elbashir SM et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498 (2001b)
 [21] Kim DH et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23, 222–226 (2005)
 [22] Reynolds A et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326–330 (2004)
 [23] Brown KM et al. Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12, 469–470 (2005)
 [24] Overhoff M et al. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 348, 871–881 (2005)
 [25] Bitko V et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50–55 (2005)
 [26] Persengiev SP et al. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10, 12–18 (2004)
 [27] Kim DH et al. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22, 321–325 (2004)

Korrespondenzadresse

Dr. Susanne Seifert
 Bio-Rad Laboratories GmbH
 Heidemannstr. 164
 80939 München
 Tel.: +49-(0)89-31884-240
 Fax: +49-(0)89-31884-123
 eMail: Susanne.Seifert@bio-rad.com
 www.bio-rad.com

INTRODUCING

Building Value Through Partnerships

BIO-EUROPE SPRING 2007

Sister Conference of BIO-Europe,
Europe's Largest Partnering Meeting

JOIN US
IN MILAN

FMC Center, Milan, Italy · March 5–7, 2007

Register now online at

www.bioeuropespring.com

EBD
GROUP
CONFERENCES & CONSULTING FOR
THE LIFE SCIENCES

In Partnership with



ASSOBIOTEC
FEDERCHIMICA

RNAi-Optimierung

siRNA-Design: Voraussetzung für effiziente Gen-Inaktivierung

Eric Lader, Qiagen Sciences, Germantown, USA; Elizabeth Scanlan und Bettina Hädrich, Qiagen GmbH, Hilden

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet die Reaktionsfolge, bei der doppelsträngige, kurze interferierende RNA (siRNA) zum Stummschalten von Genen (engl. gene silencing) führt. Ihre Entdeckung und Anwendung im Labor haben die Molekularbiologie und die Arzneimittelentwicklung revolutioniert. Nach der Erstbeschreibung der RNAi beim Fadenwurm *C. elegans*, konnte dieser Mechanismus auch bei Säugetieren und anderen eukaryotischen Spezies nachgewiesen werden¹⁻³. Bei der RNAi assoziieren siRNAs mit einem Proteinkomplex, dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). Der Antisense-Strang der siRNA bleibt an RISC gebunden, so daß komplementäre mRNAs darin binden können. Der RISC-Proteinkomplex spaltet dann die mRNA, und die Translation wird unterbunden.

Aufgrund ihres enormen Potentials wurde RNAi im Jahr 2002 von SCIENCE als „Durchbruch des Jahres“ bezeichnet⁴. In diesem Jahr wird die wissenschaftliche Leistung der RNAi-Entdecker Andrew Z. Fire und Craig C. Mello sogar mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie gewürdigt.

Eine der größten Herausforderungen ist das Design einer effektiven und spezifischen siRNA. Die Auswahl des siRNA-Zielmoleküls beeinflusst die Wirksamkeit des silencing-Effektes dabei maßgeblich. Ungewollte Nebeneffekte, sogenannte Off-target Effekte, bei denen siRNAs die Expression von Nicht-Zielgenen beeinflussen, führten zudem zu der Forderung, diese Nebeneffekte zu minimieren, um irreführende Ergebnisse zu vermeiden. Das Ziel bei der Entwicklung von Werkzeugen für das siRNA-Design ist es daher, die wirksamen Eigenschaften und eine hohe Spezifität der siRNAs zu kombinieren.

Potential der Bioinformatik

Theoretisch könnte jeder mRNA-Abschnitt von 21 Nukleotiden (nt) Länge als siRNA-Target dienen, jedoch ist das zufällige Auswählen von Zielsequenzen ein äußerst ineffizienter Ansatz beim siRNA-Design. Weit effektiver ist der Einsatz eines Design-Werkzeugs, das zu hochfunktionellen siRNA-Molekülen führt. Dies gilt besonders beim Hochdurchsatz-RNAi-Screening, in dessen Rahmen die Funktionalität jeder einzelnen siRNA nicht vorab experimentell getestet wird.

Tuschl et al.⁵ haben erste allgemeine Richtlinien für das siRNA-Design vorgeschlagen, die danach weiterentwickelt und in verschiedene Algorithmen eingebettet wurden. Dazu zählt die Empfehlung, doppelsträngige, 21 nt-lange RNA mit zwei überhängenden Nukleotiden an den Enden zu verwenden; solche RNAs

entsprechen den Produkten des Dicer-Enzyms, das *in vivo* lange doppelsträngige RNA in siRNAs zerschneidet. Des weiteren wird ein GC-Gehalt von 30% bis 70% empfohlen, der Abfolgen von Guanosin-Basen (Gs) oder Cytosin-Basen (Cs) vermeidet, da Poly-G- und Poly-C-Sequenzen den Prozeß der Gen-Inaktivierung stören.

Die erste signifikante Verbesserung des siRNA-Designs erbrachte die Analyse der Verteilung des GC-Gehaltes und des thermodynamischen Profils des siRNA-Doppelstranges^{6,7}. Doch obgleich Algorithmen, die experimentelle Ergebnisse und mechanistische Regeln berücksichtigen, die Erfolgswahrscheinlichkeit beim Design funktioneller siRNAs deutlich verbessern, besteht nach wie vor Verbesserungsbedarf. Eine der größten Limitierungen bisheriger Ansätze besteht darin, daß die Anzahl der in experimentellen Studien verwendeten Datensätze sehr niedrig liegt. Zudem sind komplexe Sequenzmotive und sich gegenseitig verstärkende Beziehungen zwischen verschiedensten Parametern oft nur sehr schwer zu identifizieren. Diese Mängel wurden von Huesken et al. bei Novartis näher untersucht⁸. Die Gruppe sammelte im Rahmen einer großen Studie zur siRNA-Funktionalität experimentelle Daten zu mehr als 2.000 siRNA-Molekülen, die für 34 Gensequenzen spezifisch sind. Dieses Datenmaterial diente zum Testen und Trainieren eines künstlichen neuronalen Netzwerkes (artificial neuronal network, ANN). ANNs sind potente Hilfsmittel, die mit Hilfe einer großen Datensatzbasis komplexe Muster erkennen und genaue Voraussagen ermöglichen können. Der entwickelte ANN-basierte Algorithmus übertraf alle anderen getesteten Algorithmen. Seine Wirksamkeit konnte in einem umfassenden Validierungsprojekt experimentell bestätigt werden, in dem mittels

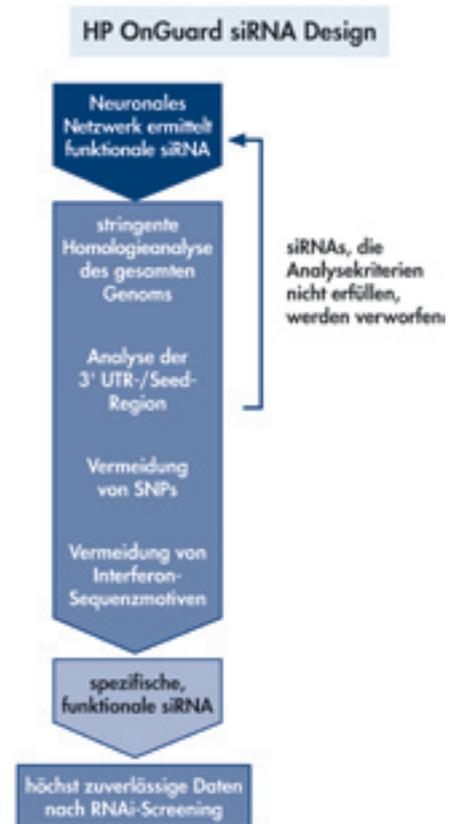
quantitativer Real-Time-RT-PCR insgesamt über 4.000 funktionelle siRNAs für mehr als 2.000 Targets identifiziert wurden (U. Krüger und S. Yerramilli, Qiagen, unveröffentlicht). Der ANN-basierte Algorithmus ist an Qiagen lizenziert worden und Bestandteil des sogenannten HP OnGuard siRNA-Designs.

Targeting

Nachdem es möglich war, siRNA-Sequenzen auf Basis ihrer potentiellen Wirksamkeit zu selektieren, galt es weitere Faktoren zu berücksichtigen, die die Spezifität der siRNA für das Zielgen beeinflussen und ungewollte, unspezifische Nebeneffekte auslösen können, wie:

- siRNA, die gegen eine zur Targetsequenz fast homologe Gensequenz gerichtet ist und mRNA-Abbau verursacht
- siRNA, die *in vivo* eine Interferon-Antwort induziert, sowie
- siRNA mit ähnlicher Aktivität wie eine microRNA (miRNA), die zur Inhibition der Translation führt.

Während des siRNA-Designs wird routinemäßig eine Homologiesuche durchgeführt, um die Spezifität der siRNA für das Zielgen sicherzustellen. Direkte BLAST-Abfragen führen jedoch meist nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, da sie eher für die Suche nach ausgedehnten Homologiebereichen in langen Sequenzen geeignet erscheinen. Beim siRNA-Design sind dagegen sehr kurze, komplementäre Sequenzabschnitte wichtig.



Fließschema des siRNA-Designs bei Qiagen

Das HP OnGuard siRNA-Design von Qiagen nutzt ein Homologieanalyse-Tool, das speziell für kurze Sequenzen entwickelt wurde.

Da die Sequenzinformationen in Datenbanken, wie denen des NCBI, beständig an die neuesten Daten angepaßt werden, ist es unbedingt notwendig, diese auch in das Design von siRNAs einfließen zu lassen. Daneben sollten auch SNPs (single nucleotide polymorphisms) in der siRNA-Zielsequenz vermieden werden, weil die siRNA sonst eine variable Effektivität bei der Gen-Inaktivierung zeigen würde.

Beides ist im HP OnGuard siRNA-Design bereits realisiert. SNPs in Targetsequenzen werden durch Integration von Informationen der RefSNP-Datenbank vermieden. Des weiteren werden im Rahmen des HP OnGuard siRNA-Designs Interferon-Sequenzmotive^{9,10} identifiziert und verworfen sowie eine 3'-UTR-/Seed-Region-Analyse durchgeführt. Jüngere Untersuchungen zeigen nämlich, daß unerwünschte Nebeneffekte durch komplementäre Sequenzen des siRNA-Antisensestranges (Position 2 bis 7) verursacht werden können, die an die nicht translatierte 3'-Region (UTR) unerwünschter mRNA-Targets binden¹¹. Bei derartigen Matches, bei denen eine vollständige Komplementarität der Seed-Region des siRNA-Stranges mit der 3'UTR-Region vorliegt, ahmt die siRNA die Aktivität sogenannter microRNAs (miRNAs) nach und löst so einen Off-target-Effekt über die Blockade der mRNA-Translation aus. Wie experimentell bestätigt, ist die Wahrscheinlichkeit für ungewollte Nebeneffekte noch höher, wenn zusätzlich zu einem Match in der Seed-Region noch ein Homologiebereich von zehn Basen oder länger vorkommt¹³. Das HP OnGuard siRNA-Design beinhaltet eine Analyse der 3'-UTR-/Seed-Region, um siRNAs mit möglichst geringem Nebeneffektpotential zu selektieren und, sofern möglich, entsprechende siRNAs zu verwerfen.

In der Praxis erleichtert ein maßgeschneidertes System den Einstieg in die RNAi-Technologie und ihre Anwendung. Das FlexiPlate siRNA-System kombiniert effektives siRNA-Design mit der Flexibilität einer anwenderspezifischen Lösung. Es ermöglicht die Zusammenstellung anwenderspezifischer siRNA-Sets, die in unterschiedlicher Substanzmenge in 96-Well-Platten erhältlich sind¹⁴. Forscher, die nur an bestimmten Genen oder Gengruppen interessiert sind, haben mit FlexiPlate siRNA die Möglichkeit, die RNAi-Technologie einzusetzen. Das System beinhaltet auch eine Anwendung für nachfolgende Experimente im Anschluß an ein Hochdurchsatz-Screening, in denen Gensequenzen, die zu interessanten Ergebnissen führten, näher analysiert werden.

Der Markt für RNAi

Der Markt für RNAi-Lösungen wächst stetig. Der weltweite Markt für Produkte und

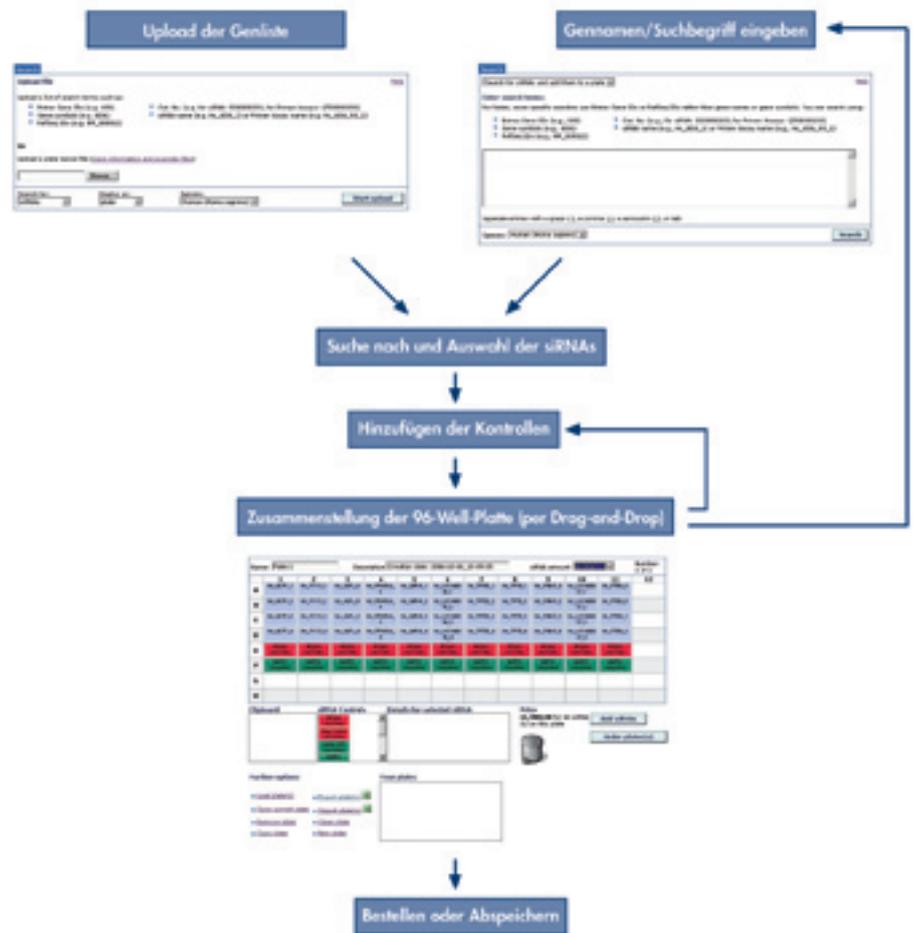


Abb. 2: Schema für individuelle siRNA-Analysen mit dem FlexiPlate-siRNA-System

Technologien rund um die RNA-Interferenz, der sich aus den Bereichen Target-Validierung, therapeutische Anwendungen und Grundlagenforschung zusammensetzt und derzeit rund 60 Mio. US-\$ ausmacht, wird Schätzungen zufolge für das Jahr 2010 auf mehr als 300 Mio. US-\$ taxiert. Vor allem in der Hochschulforschung nimmt das Interesse an der RNAi-Technologie stark zu. Aber auch die Pharmaindustrie investiert zunehmend in RNAi, wie die jüngste Akquisition Sirnas durch die Merck Inc. belegt; insgesamt bewegen sich die Investitionen in akademischen und in industriellen Forschungseinrichtungen des Pharmasektors auf einem vergleichbaren Niveau.

Eine andere Sichtweise auf den RNAi-Markt ergibt sich anhand des Durchsatzes. Viele Forscher führen RNAi-Experimente in niedrigem Probendurchsatz durch – meist werden zwischen einem und zehn Genen analysiert. Andererseits ergeben sich beim Hochdurchsatz-RNAi-Screening kompletter Genfamilien oder vollständiger Genome möglicherweise schneller wertvolle Ergebnisse, und es erfolgen weitere Investitionen. Daher screenen immer mehr Wissenschaftler auf höherem Probendurchsatz-Niveau und untersuchen ganze Gengruppen.

Aufgrund der Informationen, die mit Hilfe einer zuverlässigen und effizienten RNAi-

Methode gewonnen werden, ist damit zu rechnen, daß diese Technologie eine immer größere Verbreitung findet und zu einem Routine-Tool in molekularbiologischen Labors wird.

Literatur

- [1] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). *Nature* 391, 806.
- [2] Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). *Nature* 411, 494.
- [3] Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R.A. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9742.
- [4] Couzin, J. (2002). *Science* 298, 2296.
- [5] Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. (2002). *Methods*, 26, 199.
- [6] Khvorov, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. (2003). *Cell* 115, 209.
- [7] Schwartz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). *Cell* 115, 199.
- [8] Huesken, D. et al. (2005). *Nat. Biotechnol.* 23, 995.
- [9] Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). *Nat. Biotechnol.* 23, 457.
- [10] Hornung, V. et al. (2005). *Nat. Med.* 11, 263.
- [11] Farh, K.K. et al. (2005). *Science* 310, 1817.
- [12] Saxena, S. et al. (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 44312.
- [13] Jackson, A.L. et al. (2006). *RNA* 12, 1179.
- [14] www.Qiagen.com/GeneGlobe

Korrespondenzadresse

Dr. Bettina Hädrich
 Qiagen GmbH
 Qiagen-Straße 1
 D-40724 Hilden
 eMail: Bettina.Haedrich@qiagen.com

Neue Plattform für zellbasierte Gen-Funktionsanalysen

Dr. Christian Thirion, Dr. Ulrich Bodner, Dr. Lars Behrend, siRion GmbH, Martinsried

Die RNA-Interferenz-Technologie (RNAi) hat die Funktionsanalyse von Genen revolutioniert. Sie ist zur Standardtechnologie in vielen Laboren geworden und hat Eingang in Hochdurchsatz-Screenings zur Targetidentifizierung in der industriellen Forschung gefunden. Wegen der hohen Komplexität des Nachweises und der erforderlichen Optimierung der RNAi-Effekte bleibt die RNAi-Technologie in vielen kleineren Laboren jedoch oft auf die Funktionsanalyse einiger weniger Gene beschränkt. Zudem lassen viele Zelllinien nur ein begrenzt effizientes Einbringen von siRNA zu. Der daraus resultierende, partielle Knock-down ermöglicht keine zuverlässigen Funktionsuntersuchungen. Vor diesem Hintergrund wird ein System benötigt, das es ohne hohe Investitionskosten für Laborausstattung und Automatisierung erlaubt, eine größere Anzahl interessierender Gene funktionell zu charakterisieren.

Die Münchener Firma siRion hat das RNAi-Zellsystem Quickstep entwickelt, das die Untersuchung der Funktion einer Vielzahl von Genen ohne aufwendige Vorversuche erlaubt. Quickstep enthält Zellen, bei denen die jeweiligen Gene bereits mit Hilfe eines sehr effizienten shRNA-exprimierenden adenoviralen Vektors ausgeschaltet sind. Das Zellsystem wird bei -80 °C gelagert und für die Versuchsdurchführung in einem CO₂-Inkubator reaktiviert, wodurch die enthaltenen RNAi-Zellen binnen 24 Stunden ihre ursprüngliche Vitalität zurückgewinnen. Im Gegensatz zum Einsatz synthetischer siRNA, der oft wochenlange Vorversuche zur Transfektionsoptimierung und Knockdown-Detektion erfordert, können Gen-Funktionsanalysen mit Quickstep in wenigen Tagen durchgeführt werden. Das System ist kompatibel mit allen marktüblichen zellbasierten Analysen im Multiwell-For-

mat, zum Beispiel mit Vitalitätsmessungen, Apoptose-Tests, enzymatischen Assays oder Multiplex-Anwendungen.

Anwendungsbeispiel

Die Verlässlichkeit des Quickstep-Zellsystems für die Genfunktionsanalyse wird im folgenden exemplarisch anhand des Knockdowns des Tumorsuppressors p53 in der Darmkarzinom-Zelllinie HCT116 dargestellt. Das p53-Protein vermag genetische Veränderungen in Zellen zu erkennen und kann über die Kontrolle des Zellzyklus und des programmierten Zelltods (Apoptose) den Organismus vor unkontrolliert wachsenden Zellen und damit vor der Entstehung von Krebs schützen¹. In der Mehrzahl der humanen Tumore ist die tumorsupprimierende Funktion von p53 durch Mutationen von p53 ausgeschaltet². Auch in

der Behandlung von Tumoren spielt p53 eine wichtige Rolle. Bei kolorektalem Krebs ist bekannt, daß Tumore ohne funktionelles p53 auf eine Therapie mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil nicht oder nur sehr schlecht ansprechen³⁻⁵.

In einem Experiment mit dem Quickstep-Zellsystem wurden HCT116-Zellen mit (QSTEPshp53) und ohne Knock-down von p53 (QSTEPctr) in einem CO₂-Inkubator für 30 Minuten erwärmt. Ohne die Zellen zu passagieren, wurden durch Zugabe von 150 µl Zellkulturmedium pro Well einer Multiwellplatte die Zellen reaktiviert. 24 Stunden nach der Reaktivierung der Zellen wurde in einem Western Blot der vollständige Knock-down (>98%) des Tumorsuppressorproteins p53 in den Quickstepshp53-Zellen nachgewiesen (Abb. 1A). Zudem zeigten Zellen aus Quickstep-Platten und normal passagierte Kontrollzellen eine gleichhohe Vitalität.

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung von 5-Fluorouracil (5-FU) mit dem Quickstep-System untersucht. Dazu wurden die Zellen 24h nach Reaktivierung mit Medium überschichtet, das unterschiedliche Konzentrationen von 5-FU enthielt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit einem Zytotoxizitätsassay auf die Wirkung von 5-FU untersucht (Abb. 1B). Dabei zeigte sich, daß Quickstepshp53-Zellen unabhängig von der Konzentration von 5-FU eine Vitalität von knapp 25% behielten. Die Vitalität der Kontrollzellen mit aktivem p53 sank dagegen bei einer Konzentration von 500 µM 5-FU auf unter 5%. Diese Ergebnisse belegen, daß in kolorektalen Krebszellen die Sensitivität gegenüber 5-FU von p53 abhängig ist und bestätigen damit die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse aus *in vivo*-^{3,5} und *in vitro*-Studien⁴. Durch die Erweiterung des Quickstep-Systems auf weitere wichtige Gene wird ein Werkzeug verfügbar, das die Genfunktionsanalyse vieler Gene in kurzer Zeit ermöglicht.

Literatur

- [1] Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 13(3):332-7.
- [2] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *Science* (1991) 253(5015):49-5
- [3] Ahnen D.J., Feigl P., Quan G., Fenoglio-Preiser C., Lovato L.C., Bunn P.A. Jr, Stemmerman G., Wells J.D., Macdonald J.S., Meyskens F.L. Jr. *Cancer Res.* (1998) 58:1149-1158
- [4] Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B., *J Clin Invest.* (1999) 104:263-269.
- [5] Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L. *Tumor Biology* (2004) 25:258-263

Korrespondenzadresse

siRion GmbH
 Dr. Lars Behrend
 Am Kopperspitz 19, 82152 Martinsried
 Tel./Fax: +49-(0)89-700961999/-700961990
 info@sirion-biotech.de, sirion-biotech.com

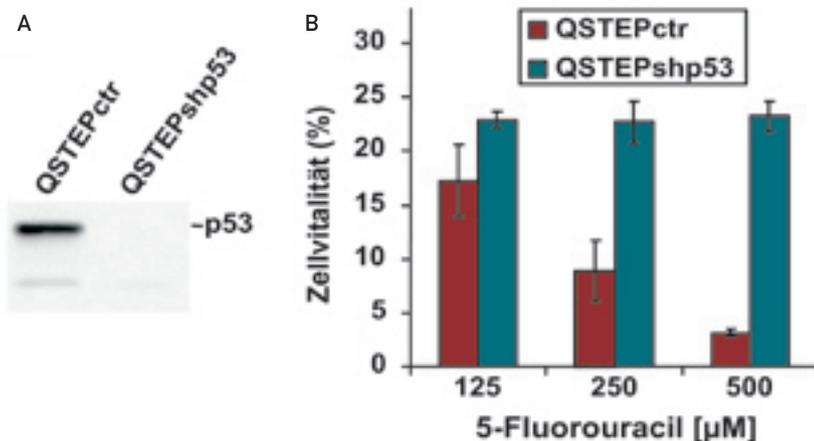
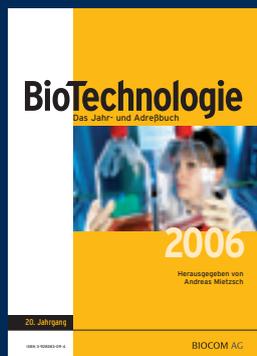


Abb.1: (A) Western Blot-Analyse von Quickstepshp53-Zellen im Vergleich zu Quickstepctr 24h nach Reaktivierung. (B) Zytotoxizitätsassay mit dem Quickstep-System in HCT116-Zellen mit funktionellem p53 (QSTEPctr) und p53-Knockdown (QSTEPshp53). Nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Fluorouracil wurde nach 48 h ein WST-1-Assay durchgeführt und durch den Vergleich mit unbehandelten HCT116-Zellen die Vitalität bestimmt.

FACTBOOK

Neu: Das Jahr- und Adreßbuch 2006!



Das **BioTechnologie Jahr- und Adreßbuch** ist das Standardwerk der Biotechnologie im deutschsprachigen Europa. Es enthält im 20. Jahrgang neben den neuesten statistischen Zahlen und Fakten zur Biotech-Branche rund 1.700 Datensätze aller Firmen, Organisationen und Ämter, die sich in Deutschland, der Schweiz und Österreich mit Biotechnologie befassen.

BioTechnologie

Das Jahr und Adreßbuch

32,80 €

2006, ISBN 3-928383-09-4

Tel. +49 (0)30/26 49 21-0

Fax +49 (0)30/26 49 21-11

eMail service@biocom.de

Web www.biocom.de



Large Scale-RNAi-Screening für Mensch und Maus

Dr. Andreas Hewelt, RZPD GmbH, Berlin

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) hat dieser Mechanismus zum gezielten Ausschalten von Genen weite Verbreitung in loss-of-function-Experimenten zur Analyse von Genfunktionen gefunden. Zur Herstellung einer genomweiten RNAi-Ressource für Mensch und Maus hat sich 2005 das internationale RNAi Consortium (TRC) gegründet. Mitglieder des TRC rekrutieren sich aus renommierten Instituten, wie dem Broad Institute, MIT, der Harvard Medical School, dem Whitehead Institute for Biomedical Research und anderen. Auch große Life-Science-Firmen haben sich dem RNAi Consortium angeschlossen. Dazu zählen Sigma-Aldrich, Novartis, Eli Lilly und Bristol-Myers Squibb.

Ziel ist die Entwicklung von RNAi-Ressourcen, speziell shRNA-Bibliotheken, für den gezielten Knock-down von Genen in Mensch und Maus. Diese Ressourcen werden der wissenschaftlichen Gemeinschaft weltweit zur Analyse von Genfunktionen und Krankheiten zur Verfügung gestellt. Die TRC shRNA libraries werden shRNAs zum Knock-down von je 15.000 Genen aus Mensch und Maus bereitstellen. Analysen dieser Größenordnungen erfordern eine leicht erneuerbare Ressource. Dazu werden genspezifische shRNAs in die Expressionskassette des lentiviralen Vektor pLKO.1-puro kloniert, der einfach in *E. coli* propagiert werden kann. Die Expressionskassette enthält im wesentlichen den humanen U6-Promotor, der die Transkription der shRNA kontrolliert, und PAC (Puromycinresi-

stenz) unter der Kontrolle des PGK-Promotors als Selektionsmarker (s. Abb.). Für jedes Gen werden durchschnittlich fünf verschiedene shRNA-Klone konstruiert, die verschiedene Bereiche der kodierenden Sequenz und der 3'-UTR des Gens abdecken. Da es unwahrscheinlich ist, daß shRNAs mit verschiedenen Sequenzen die gleichen off-target-Effekte hervorrufen, führt das Screening von verschiedenen shRNAs, die gegen dasselbe Gen gerichtet sind, zu spezifischeren Ergebnissen. Im Gegensatz zu extern applizierten siRNAs werden die shRNAs der TRC-Klone in einer Expressionskassette in die Zielzelle transfiziert. Die fortlaufende Synthese der shRNA innerhalb der Zielzelle ermöglicht die Analyse von Effekten, die eine langfristige Regulierung der Genexpression erfordern.

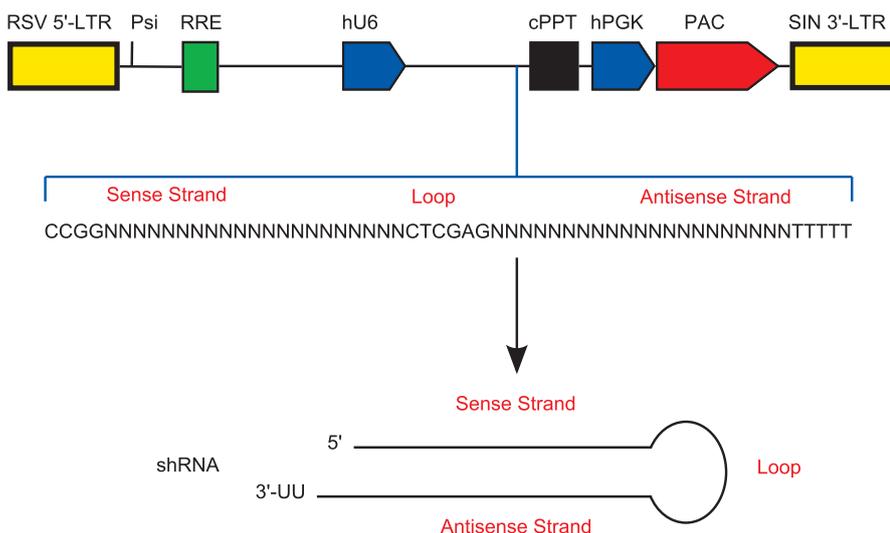


Abb.: Expressionskassette des lentiviralen Vektors pLKO.1-puro. pLKO.1-puro ist ein lentiviraler Vektor der dritten Generation. Die Expressionskassette enthält lentivirale Signale zur Verpackung in Viruspartikel und Elemente zur Expression der shRNA.

RSV/5' LTR=Rous Sarcoma Virus Promotor, HIV 5' LTR, Psi=lentivirales Verpackungssignal für die virale RNA, RRE=Rev-responsive Element, hU6=humaner U6-Promotor, cPPT=zentraler Polypurin-Trakt, hPGK=humaner PGK-Promotor, PAC=Puromycinresistenzgen, SIN/3' LTR=HIV 3' LTR mit einer selbstinaktivierenden U3-Deletion (nach Moffat et al., 2006)

Für einen stabilen Gen-Knock-down können genspezifische shRNA-Expressionkassetten über replikationsinaktive lentivirale Transduktionspartikel in das Genom der Zielzelle integriert werden. Dazu wird die Expressionkassette mit einem Drei-Plasmid-Verpackungssystem in lentivirale Transduktionspartikel verpackt. Die Wahrscheinlichkeit, durch Rekombination replikationsfähige Viruspartikel zu erhalten, wird durch die Verteilung der Gene *gag*, *pol*, *rev* und das Gen, das für VSV-G kodiert, auf verschiedene Plasmide minimiert. Lentivirale Vektoren haben den Vorteil, daß sie Viren mit breitem Tropismus und einem hohen Titer generieren. Durch die Pseudotypisierung mit VSV-G ist nahezu jeder Zelltyp für die so produzierten Lentiviren zugänglich. Mit lentiviralen Transduktionspartikeln der TRC libraries können auch Zellen erfolgreich transduziert werden, die allgemein als schwer transfizierbar gelten, etwa primäre Zellen und langsamwachsende oder teilungsinaktive Zellen¹.

Lentivirale Vektoren haben ein hohes Rekombinationspotential, möglicherweise bedingt durch die repetitiven Sequenzen in den LTRs. Zur Untersuchung der Stabilität des pLKO.1-puro-Vektors wurden mehrfach shRNA-Klone kopiert. Restriktionsanalysen der isolierten Plasmide ergaben keine Anzeichen für Rekombination.

Die TRC shRNA libraries haben ihr Potential in Hochdurchsatz-RNAi-Screens bereits demonstriert. Moffat et al. haben die Produktion der lentiviralen Transduktionspartikel semi-automatisiert und die erhaltenen Virusüberstände direkt zur Transduktion von A549-Lungenkrebszellen in Mikrotiterplatten eingesetzt. Dabei waren 87% der Transduktionsversuche mit unverändertem Virusüberstand erfolgreich. Auch die Verwendung von Pools lentiviraler Transduktionspartikel wurde erfolgreich getestet. Die shRNA libraries des RNAi Consortiums sind als MISSION™ shRNA libraries als 'ready-to-transfect'-DNA und lentivirale Transduktionspartikel exklusiv beim RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (www.rzpd.de) und Sigma Aldrich verfügbar.

Literatur

- [1] Moffat, J. et al. Cell 2006, 124, 1283-1298
- [2] Root, D. et al. Nat. Methods 2006, 3, 715-719
- [3] The RNAi Consortium (TRC) www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/
- [4] Sigma Aldrich www.sigmaldrich.com
- [5] RZPD www.rzpd.de

Korrespondenzadresse

Dr. Andreas Hewelt
RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
Heubnerweg 6
D-14959 Berlin
eMail: hewelt@rzpd.de

Sensitive Schnell-Detektion von *S. aureus* und MRSA

Lukas Wick, Urs Spitz, Biosynth AG, Staad; Günther Petersen, Dolder AG, Basel; Klaus Memmert, Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel, Schweiz

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) gehören gegenwärtig zu den häufigsten und problematischsten nosokomialen Krankheitserregern weltweit. Simple, kostengünstige, schnelle und selektive diagnostische Methoden sind gefragt, um die Ausbreitung von MRSA einzudämmen und Infektionen zu reduzieren. Der Einsatz des Eisenchelators Ferrioxamin in Kulturmedien verspricht, die Schnelligkeit und Selektivität der MRSA-Diagnose zu erhöhen. Ebenso kann die Wirkung von Ferrioxamin E in Kulturmedien zum Nachweis von *S. aureus* in Nahrungsmitteln genutzt werden.

Eisen ist ein lebenswichtiges Element für fast alle Bakterien. Es spielt eine wichtige Rolle als Kofaktor für eine Vielzahl von Enzymen. Unter aeroben Bedingungen, bei neutralem pH-Wert liegt Eisen als Fe^{3+} jedoch in schwerlöslichen Hydroxidkomplexen vor. In höheren Lebewesen ist Eisen an starke Komplexbildner wie Lactoferrin und Transferrin gebunden. Sei es also in der Umwelt oder in einem Wirtsorganismus – Bakterien sind mit dem Problem konfrontiert, Eisen für Wachstum und Metabolismus verfügbar zu machen.

Kampf um Eisen

Eine Strategie der Mikroorganismen ist die Produktion von Eisenchelatoren, sogenannten Siderophoren, die dank ihrer hohen Affinität das Eisen aus den schwerlöslichen Hydroxidkomplexen herauslösen oder auch von den Wirts-Chelatoren ablösen können. Siderophore werden von den Bakterien ausgeschieden und binden dann extrazelluläres Fe^{3+} . Der Eisen-Siderophorkomplex wird durch spezifische Transportsysteme durch die Membran in die Bakterienzelle transportiert, wo er, meist durch Reduktion zu Fe^{2+} , freigesetzt und genutzt wird. Es gibt

mehr als 500 verschiedene Siderophore, und viele Bakterienspezies produzieren gleich mehrere davon. Auch können viele Bakterien nicht nur ihre eigenen (endogene), sondern auch Siderophore für ihre Eisenversorgung nutzen, die von anderen (exogene) Mikroorganismen produziert wurden. Siderophore enthalten vielfach ein Peptidrückgrat mit Gruppen, die Eisen über starke Bindungen komplexieren. Die drei komplexierenden Hauptgruppen sind: Hydroxamate (etwa in Aerobactin, Ferrichromen, Ferrioxaminen), Catechole (in Enterobactin) und Thiazolin- und Oxazolinringe (z.B. in Pyochelin). Eine Gruppe von Hydroxamat-Siderophoren sind die Ferrioxamine (Abb. 1), die von verschiedenen Bakterienspezies produziert werden (z.B. Bodenbakterien wie *Streptomyces* spp., aber auch von *Enterobacteriaceae* wie *Enterobacter-Pantoea*-spp.) In der eisenfreien Form werden diese Chelatoren als Desferrioxamine bezeichnet. Neben den Produzenten gibt es eine Reihe anderer Spezies, die Ferrioxamine nicht bilden, aber aufnehmen können (*Salmonella* spp., *Bacillus subtilis*, *Neurospora*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*). Andere Bakterienspezies können Ferrioxamine weder herstellen noch aufnehmen, wie etwa *Escherichia coli* und die meisten

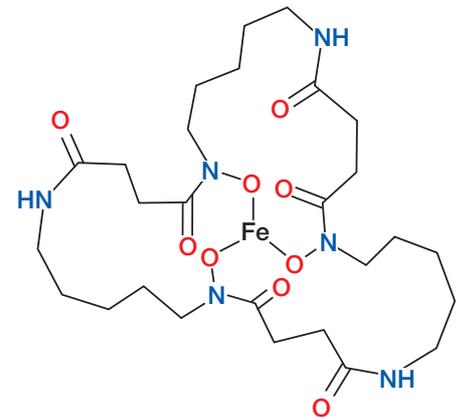


Abb. 1: Struktur von Ferrioxamin E

Koagulase-negativen Staphylokokken. Tritt in einer bestimmten Umgebung das Eisen vor allem im Komplex mit Ferrioxaminen auf, wird selektiv das Wachstum von Bakterien gefördert, die Ferrioxamine aufnehmen können.

Ferrioxamine: selektive Wachstumsfaktoren

Es gibt verschiedene Formen von Ferrioxaminen, die nomenklatorisch mit lateinischen Buchstaben unterschieden werden. Ferrioxamin B ist etwa das Haupt-Ferrioxamin, das von *Streptomyces pilosus* produziert wird¹. Unter dem Namen Desferal® (Novartis AG, Basel) wird Desferrioxamin B zur Behandlung von Patienten mit Eisen- oder Aluminiumüberschuß eingesetzt. Nach der Aufnahme des Eisens kann Ferrioxamin B pathogenen Mikroorganismen aber als Eisenquelle dienen. Dies führt dazu, daß mit Desferrioxamin B behandelte Patienten an Bakteriämie durch *Yersinia enterocolitica* und *Staphylococcus aureus* erkranken können². Was in dem einen Fall eine unerwünschte Nebenwirkung ist, kann aber in der medizinischen Diagnostik zum Vorteil genutzt werden. So konnte gezeigt werden, daß der Zusatz von Ferrioxaminen zu Nährmedien das Wachstum bestimmter Bakterienarten fördert und zugleich andere Bakterien hemmt. Dies erhöht die Sensitivität und Selektivität solcher Medien. So dient Ferrioxamin E als Wachstumsfaktor für Salmonellen, während es *Escherichia coli* und die *Proteus-Providencia-Morganella*-Gruppe hemmt. Dies zeigte sich vor allem vorteilhaft bei der Anreicherung von Salmonellen aus Hühnereiweiß¹¹⁻¹².

Hühnereiweiß enthält Ovotransferrin, das Eisen bindet und dadurch das mikrobielle Wachstum hemmt. Der Zusatz von Ferrioxamin E hebt diese Eisenlimitation spezifisch für Bakterien auf, die Ferrioxamin E verwenden können. Zusätzlich hilft Ferrioxamin E bei der Wiederbelebung gestreifter Salmonellen¹⁰. Derart gestreifte Zellen sind auf oder in konventionellen Kulturmedien nur schwer oder gar nicht zu kultivieren. Andere Bak-

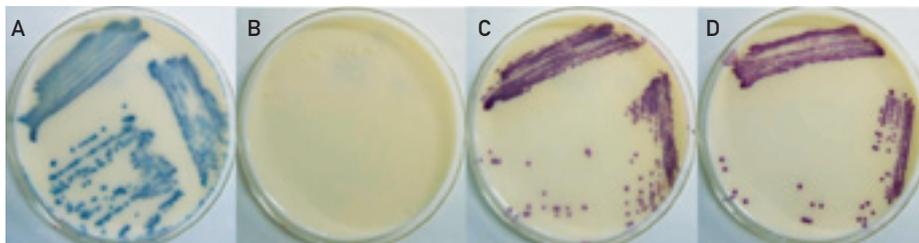


Abb. 2: MRSA (A) wachsen als lapisblaue Kolonien, während ein großer Teil der Begleitflora im Wachstum gehemmt wird. Bakterien, die dennoch wachsen, können dank unterschiedlicher Färbung gut von MRSA unterschieden werden, wie zum Beispiel: *Staphylococcus haemolyticus* (B), *Serratia marcescens* (C) und *Enterobacter asburiae* (D). Bilder mit freundlicher Genehmigung von Eiken Chemical Co., Japan.

terien, denen Ferrioxamine als Eisenquellen dienen können, sind *Bacillus subtilis*⁸, *Pseudomonas aeruginosa*⁵, *Enterobacter sakazakii*, und wie oben schon erwähnt *Yersinia enterocolitica* und *Staphylococcus aureus*^{2,4}. Ferrioxamin E wird bei der Novartis AG biotechnologisch aus *Streptomyces antibioticum* hergestellt und durch die Dolder AG (Basel, Schweiz) unter dem Namen Dolder[®] Fox vertrieben.

MRSA: die Nummer 1 bei den Spitalinfektionen

Staphylococcus aureus sind weltweit die häufigsten Erreger bei nosokomialen, also im Krankenhaus erworbenen Infektionen. Diese normalerweise harmlosen Bewohner der Haut können schwere Infektionen auslösen, wenn sie durch Wunden in den Körper gelangen. Etwa ein Drittel der Patienten mit einer *S. aureus*-Bakteriämie stirbt innerhalb von 30 Tagen⁹.

Früher konnten solche Infektionen mit Penicillin, nach Auftreten von Penicillin-resistenten Keimen mit Methicillin behandelt werden. Besonders besorgniserregend ist aber das Auftreten Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA), die auch gegen die meisten anderen Antibiotika resistent geworden sind. Solche MRSA-Stämme führen in vielen Ländern jährlich zu einigen Tausend Toten, und die Tendenz ist in den meisten Ländern steigend. So sterben, konservativen Schätzungen zufolge, in England mindestens 5.000 Personen pro Jahr an MRSA-Infektionen, die sie im Krankenhaus erworben haben. Andere Schätzungen gehen davon aus, daß tatsächlich bis zu 20.000 Tote pro Jahr durch MRSA zu beklagen sind.

Die wirksamste Methode zur Eindämmung von MRSA-Infektionen scheint eine aggressive ‚search and destroy‘-Strategie zu sein. Dabei werden Krankenhausangestellte und Patienten auf die Kolonisation von MRSA gescreent, infizierte Personen isoliert und die MRSA mit den wenigen noch wirksamen Antibiotika abgetötet. Tatsächlich sind etwa in Holland, das eine solche Politik strikt verfolgt, MRSA-Fälle viel seltener als in Ländern mit weniger strengen Screeningmaßnahmen: MRSA werden dort in Blutisolaten um den Faktor 100 seltener gefunden als in England¹³.

Um ‚search and destroy‘ auf breiter Basis erfolgreich durchführen zu können sind schnelle, einfache und kostengünstige Detektionsmethoden nötig. Der „Golden Standard“ zum MRSA-Nachweis ist die *mecA*-PCR. Das Gen *mecA* codiert für das Penicillin-bindende Protein PBP2', das eine stark reduzierte Affinität zu Methicillin, Oxacillin und anderen β -Lactamase-Antibiotika aufweist. Durch diese Antibiotika wird daher die Peptidoglycansynthese wenig gestört und die MRSA in ihrem Wachstum nicht gehemmt. Neben der *mecA*-PCR sind

auch Latex-Agglutinationstest zum Nachweis von PBP2' vorhanden. Diese Methoden benötigen jedoch hohe Keimzahlen (> 10⁵ cfu/ml) an MRSA. Man kann bei diesen Agglutinationstests von verdächtigen Isola-

meist gehemmt und würden deshalb auf einem Oxacillin-basierten Medium nicht erkannt werden³. Weitere selektive Wirkstoffe in BCM[®] MRSA 2.1 hemmen einen großen Teil der Begleitmikroflora, und auch BORSA

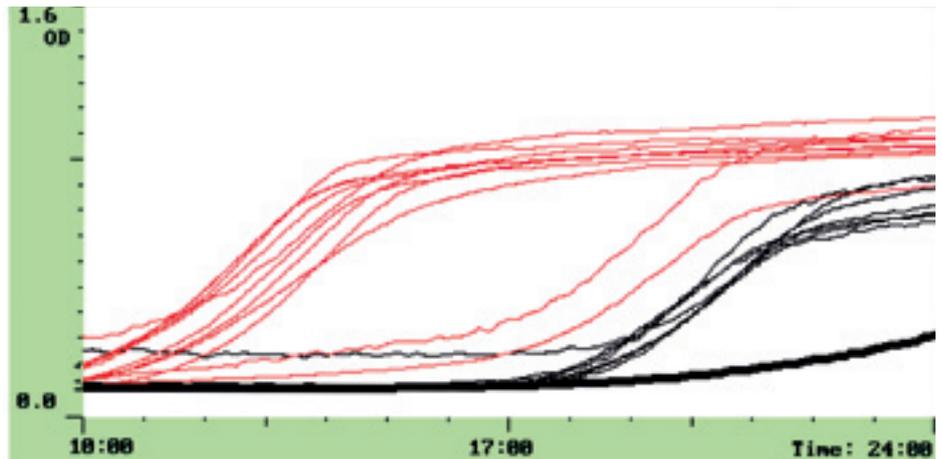


Abb. 3: Wachstum von MRSA (RKI-Nr. 02-03545) in Brain Heart-Infusion ohne (schwarz) und mit (rot) Ferrioxamin E (100 ng/ml), gemessen im Bioscreen C (Oy Growth Curves AB). Jede einzelne Kurve repräsentiert eine replizierte Messung in einer separaten Meßzelle.

ten auf den konventionellen Blutagar oder Mannit-Kochsalz-Agar, auch mit Zusatz von 1 µg/ml Oxacillin ausgehen. Die zusätzlichen Tests der verdächtigen Kolonien durch *mecA*-PCR oder Latex-Agglutinationstest auf PBP2' ist aber zeitaufwendig und teuer, da in der Regel mehrere auf den konventionellen Kulturmedien gewachsene Kolonien geprüft werden müssen. Deshalb wurden Selektivnährböden entwickelt, die MRSA in charakteristischen Kolonien wachsen lassen. Dadurch wird die Zeit für Abwehrmaßnahmen in den Krankenhäusern verkürzt, die Kosten verringern sich. Verschiedene Kulturmedien zur Detektion von MRSA existieren, und Verbesserungen zielen darauf ab, noch schnellere und selektivere Kulturmedien zu entwickeln.

Neues selektives MRSA-Nährmedium

Biosynth bietet neu ein chromogenes MRSA plating medium (BCM[®] MRSA 2.1) an, das neueste Kenntnisse vereint und eine schnelle Detektion von MRSA in nur 12 bis 18 Stunden ermöglicht. Als hauptsächlich selektives Antibiotikum wird dabei Cefoxitin anstatt Oxacillin oder Methicillin eingesetzt. Auf einem Nährboden mit Cefoxitin wachsen MRSA viel früher als auf oxacillinhaltigen Medien, wahrscheinlich durch die stärkere Induktion von PBP2' durch Cefoxitin. Des weiteren ist Cefoxitin wesentlich sensitiver und detektiert auch MRSA-Stämme mit wenig ausgeprägter Resistenz (auch solche mit einem MIC-Wert von nur 0,5 µg Oxacillin/ml), während alle Methicillin-sensitiven *S. aureus* (MSSA) gehemmt werden. Stämme mit nur geringer Methicillinresistenz werden durch Oxacillin

(borderline oxacillin-resistent *Staphylococcus aureus*) wachsen nicht.

Begleitflora, die trotz der selektiven Hemmstoffe wächst, kann dank der Kombination verschiedener chromogener Substrate gut von MRSA unterschieden werden. MRSA-Stämme wachsen innerhalb von 12 bis 18 Stunden bei 37 °C als lapisfarbene Kolonien (mind. 1 mm Durchmesser in 24 h), resistente *S. haemolyticus*-Stämme als weiße Kolonien. Enterokokken erscheinen als kleine rosa bis violette Kolonien, resistente Enterobacteriaceae als rosa bis violette Kolonien von bis 2 mm Durchmesser (Abb. 2).

Der Zusatz von Ferrioxamin E verbessert das Wachstum der MRSA und verringert dadurch die Zeit zur Detektion von MRSA. Supplementierung von Brain Heart Infusion (BHI) mit Ferrioxamin E als Anreicherungs-nährmedium förderte das Wachstum von MRSA, wie durch Experimente im Bioscreen C (Oy Growth Curves AB) gezeigt werden konnte (Abb. 3). Durch die richtige Kombination von Ferrioxamin E und Desferrioxamin B wird die Selektivität des Agars optimiert. Das Ferrioxamin E stellt sicher, daß genug Eisen in einer für MRSA wachstumsfördernden Form vorhanden ist. Desferrioxamin B seinerseits komplexiert Eisen, das in anderer Form im Medium allfällig vorhanden ist und entzieht dieses Eisen dadurch einem guten Teil der Begleitflora. So werden die häufigsten Staphylokokken der Haut, *S. epidermidis* und *S. hominis*, von Desferrioxamin B in ihrem Wachstum gehemmt. Während *S. epidermidis* schon bei relativ geringen Desferrioxamin-konzentrationen nicht mehr wächst, sind für eine effektive Inhibition von *S. hominis* etwas höhere Konzentrationen erforderlich^{4,7}.

In der Tat zeigten Kulturmedien mit Zusatz von Desferrioxamin eine höhere Selektivität und Sensitivität im Vergleich zu anderem Agar^{6,14}.

Fazit

Das BCM® MRSA 2.1 plating medium kombiniert die Vorteile von chromogenen Substraten und ausgewählten selektiven Wachstums- und Hemmstoffen zu einem Medium, das schnelle (12-16 Std.), sensitive und selektive Erkennung von MRSA ermöglicht. Dieses Kulturmedium dürfte im Dienste einer „search and destroy“-Strategie helfen, die Opferzahlen von MRSA-Infektionen deutlich zu verringern. Als selektiver Wachstumsfaktor trägt Ferrioxamin E entscheidend zur Schnelligkeit und Selektivität dieses Nährmediums bei. Dieselbe Wirkung von Ferrioxamin E wird auch in einem neuentwickelten Agar-Nährboden zur Detektion von *S. aureus* in Nahrungsmitteln genutzt (BCM® *Staphylococcus aureus* Plating Medium).

Ein wachstumsfördernder Effekt auf andere pathogene Bakterien wie *Salmonella* spp., *Enterobacter sakazakii*, *Yersinia enterocolitica* verspricht auch einen entscheidenden Nutzen von Ferrioxamin E in der Diagnostik dieser Krankheitserreger.

Literatur

- [1] Bickel et al. *Helv Chim Acta*. 1960;43:2129
- [2] Brock and Ng. *FEMS Microbiol Lett*. 1983; 20:439
- [3] Felten et al. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2766
- [4] Heuck et al. *Zbl Bakt*. 1994; 280:304
- [5] Llamas et al. *J Bact*. 2006; 188:1882
- [6] Monsen et al. *J Hosp Infect*. 2003; 54:216
- [7] Mulder JG. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14:1052
- [8] Ollinger et al. *J Bact*. 2006; 188:3664
- [9] Paul J. *BMJ*. 2006; 333:269
- [10] Reissbrodt et al. *Appl Env Microbiol*. 2000; 66:4128
- [11] Reissbrodt et al. *Int J Food Microbiol*. 1996; 29:81
- [12] Thammasuvimol et al. *J Food Prot*. 2006; 69:634
- [13] Tiemersma et al. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10:1627
- [14] Zadik et al. *J Med Microbiol*. 2001; 50:476

Korrespondenzadressen

Dr. Lukas Wick
 Microbiology
 Biosynth AG, CH-9422 Staad
 Tel.: +41-(0)71 858 20 20
 eMail: lukas.wick@biosynth.ch

Dr. Klaus Memmert
 Novartis Institutes for Biomedical Research
 CH-4002 Basel
 Tel.: +41-(0)61 324 6885
 eMail: klaus.memmert@novartis.com

Günther Petersen
 Dolder AG
 Immengasse 9
 CH-4004 Basel
 Tel.: +41-(0)61 326 66 88
 Fax: +41-(0)61 381 63 06
 eMail: guenther.petersen@dolder.com

Wirkstoffentwicklung

RNAi als Grundlage für neue Therapeutika: aktueller Stand

Dr. Roland Kreutzer, Dr. Matthias John und Dr. Hans-Peter Vornlocher,
 Alnylam Europe AG, Kulmbach

Schon wenige Jahre nach der ersten Beschreibung der RNA-Interferenz (RNAi) beim Fadenwurm wurde der Nobelpreis für die Entdeckung dieses neuen biologischen Prinzips vergeben, das zu bahnbrechenden Neuerungen in der biologischen Forschung und hohen Erwartungen der Pharma- und Biotechnologieindustrie geführt hat. Während die RNAi aus der Forschung nicht mehr wegzudenken ist, befinden sich bereits erste Medikamente auf Basis der RNAi in der klinischen Prüfung. Als die wesentlichen Hürden auf dem Weg zum breiten therapeutischen Einsatz von RNAi-Medikamenten werden die Spezifität und die Zielsteuerung der Wirkstoffe erachtet. Es wurden hier jedoch in kurzer Zeit große Fortschritte erzielt und vielversprechende Ansätze zur Überwindung dieser Hürden entwickelt.

Key Words: RNA-Interferenz, RNAi, siRNA, Therapeutika

Anfang Oktober 2006 wurden die Preisträger des diesjährigen Nobelpreises für Physiologie oder Medizin bekanntgegeben: Die US-amerikanischen Biologen Andrew Fire und Craig Mello erhalten ihn am 10. Dezember in Stockholm – gerade einmal neun Jahre, nachdem sie die RNA-Interferenz (RNAi) als neues biologisches Prinzip beim Fadenwurm erstmals beschrieben¹. Bei der RNAi wird ein höchst effizienter zellulärer Prozess in Gang gesetzt, der sehr spezifisch zum Stummschalten eines Gens führt. Die RNAi wird inzwischen weltweit als das derzeit beste verfügbare Hilfsmittel zur Identifizierung von Genfunktionen und zur

Validierung therapeutisch relevanter Gene und Stoffwechselwege eingesetzt. Zudem könnten auf Basis der RNAi eine Klasse neuer Medikamente entstehen².

Daß die mit dem Nobelpreis honorierte Entdeckung der RNAi beim Fadenwurm auch zur medizinischen Anwendung beim Menschen führen könnte, lassen vor allem zwei Publikationen von Wissenschaftlern der Alnylam Pharmaceuticals Inc. (Cambridge, USA) und Alnylam Europe AG (Kulmbach) erkennen, in denen das therapeutische Potential von RNAi-Wirkstoffen klar aufgezeigt wird. Durch synthetische, chemisch modifizierte und mit einer lipo-

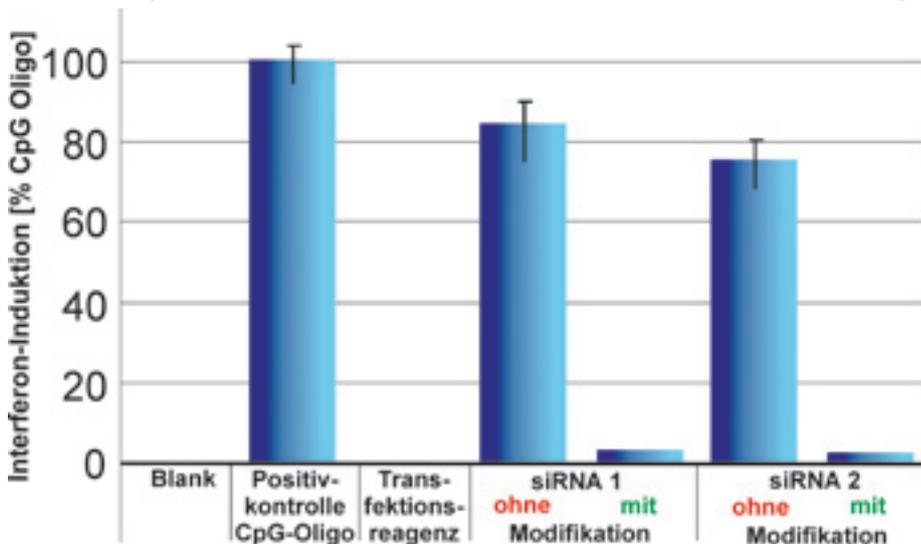


Abb. 1: Chemische Modifikation der siRNA zur Reduktion der Interferon-alpha-Induktion. Als Positivkontrolle diente ein DNA-Oligonukleotid (ODN2216), das aufgrund von CpG-Motiven stark induzierend wirkt. Während unmodifizierte siRNAs eine deutliche Interferon-Induktion (in % der Positivkontrolle) zeigen, verschwindet die induzierende Eigenschaft nach Modifikation fast vollständig, wobei die RNAi-Aktivität vollständig erhalten bleibt.

philen Gruppe konjugierte³ oder in Lipopartikel verpackte⁴ short interfering RNAs (siRNAs) konnten im Tierexperiment deutliche und sehr spezifische therapeutische Effekte nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten könnte die RNAi zur nächsten großen Therapeutikaplattform heranwachsen, von der aus möglicherweise eine ganze Palette von Medikamenten zur gezielten Hemmung der Expression krankheitsassoziierten Gene – darunter auch sogenannter non-druggable Targets – entwickelt werden kann. Es ist relativ einfach, geeignete siRNAs für die Genanalyse in Zellkultur zu identifizieren und herzustellen. Für die Entwicklung eines siRNA-Wirkstoffes ist die Effizienz der Inhibition der Genexpression allein nicht ausreichend. Die Stabilität, Bioverfügbarkeit und vor allem die Spezifität und Sicherheit sind ebenfalls maßgeblich⁵.

Stabilität und Bioverfügbarkeit

Nackte siRNAs überleben Angriffe von Nucleasen im Blutplasma oder anderen Körperflüssigkeiten nur kurze Zeit. Um die Stabilität zu erhöhen, haben sich chemische Modifikationen der Ribose oder Phosphordiesterbindung als nützlich erwiesen. Insbesondere werden Thiophosphate (P=S) eingesetzt, um die RNA am 3'-Ende vor exonukleolytischem Abbau zu schützen. Zum Schutz vor Endonucleasen dienen ebenfalls Modifikationen der Ribose (2'-O-Methyl, 2'-Fluoro) im Bereich bestimmter Erkennungssequenzen.

Spezifität und Sicherheit

Bei den bisherigen Anwendungen bei Tier und Mensch zeigte sich in der Regel eine gute Verträglichkeit von siRNAs. Trotzdem muß bei der Auswahl geeigneter Kandidaten sorgfältig darauf geachtet werden, daß keine siRNAs mit unerwünschten Eigenschaften zum Einsatz kommen^{6,7}. Solche sogenannten Off-target-Effekte können verschiedene Ursachen haben.

Zum einen können bestimmte siRNAs Zellen des Immunsystems unspezifisch stimulieren⁸. Dies geschieht durch Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren im Endosom der Zellen. Diese Rezeptoren reagieren auf ausgewählte RNA-Sequenzen mit der Einleitung einer Signalkaskade, die letztlich zur Freisetzung von Interferon- α und anderen Cytokinen führt, was erhebliche Nebenwirkungen für den Organismus nach sich ziehen kann. Diese Immunstimulation kann jedoch durch chemische Modifikation der siRNA vermieden werden (Abb. 1), zum Beispiel mit 2'-O-Methyl- oder 2'-Fluoro-Gruppen oder den Einbau von LNA (Locked-Nucleotide-Acid)-Bausteinen.

Wenn die ausgewählte siRNA in hohem Maße komplementär zu einer anderen

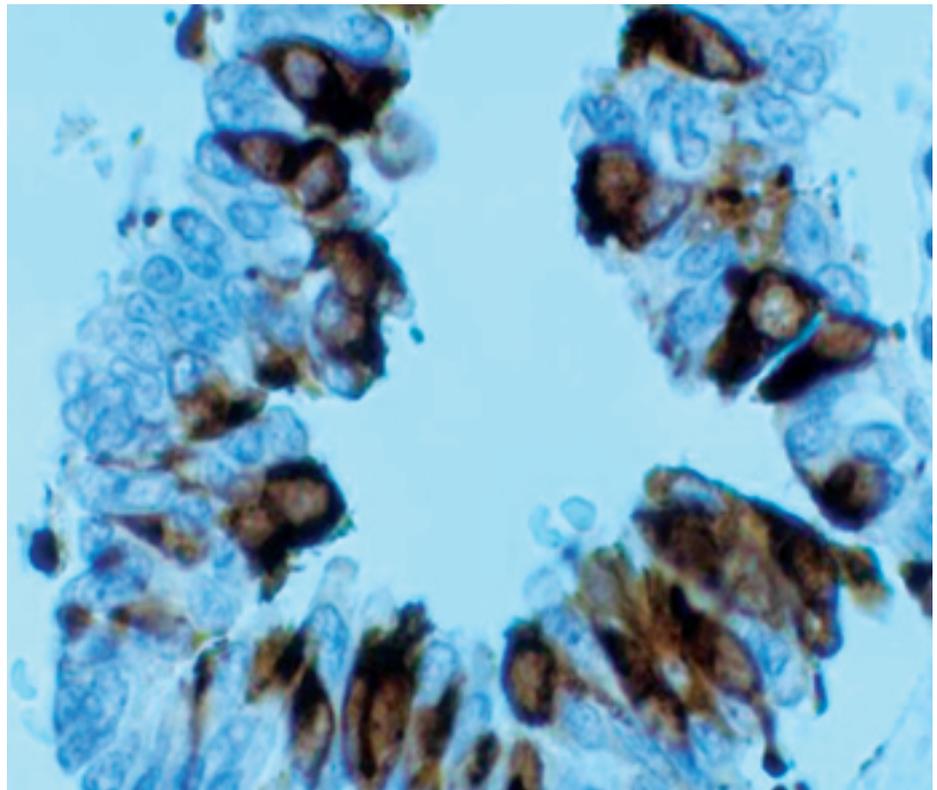


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung eines Bronchialepithelschnitts (mit freundlicher Genehmigung von Barney Graham). Die braun angefärbten, mit RSV infizierten Zellen liegen an der Oberfläche und sind für siRNA-haltige Aerosolen zugänglich.

mRNA als der Ziel-mRNA ist – insbesondere zwischen den Nucleotiden zwei bis acht am 5'-Ende des aktiven siRNA-Strangs (Seed-Region) –, kann es zu einer anderen Art von Off-target-Effekten kommen. Diese partielle Homologie kann zum unerwünschten Abbau einer sequenzverwandten mRNA führen. Außerdem kann eine siRNA unbeabsichtigt den Weg einer microRNA (miRNA) nehmen und so die Inhibition der Translation und erhöhte Destabilisierung der mRNA einzelner Gene bewirken. Ein solches Off-targeting kann durch strenge Sequenzauswahl reduziert werden, indem also darauf geachtet wird, daß die Seed-Region der siRNA möglichst spezifisch nur mit der Ziel-mRNA hybridisiert. Des weiteren kann durch klug positionierte 2'-O-Methyl-Modifikationen innerhalb der Seed-Region das Risiko von Off-target-Effekten weiter verringert werden, ohne daß die Wirksamkeit der siRNA dabei verlorenght.

Neben dem Einsatz synthetischer siRNAs sind auch gentherapeutische Ansätze zur RNAi beschrieben worden. Hierbei werden in der Zelle von Vektoren aus sogenannte short hairpin RNAs (shRNAs) exprimiert, die dann zu siRNAs prozessiert werden und wie diese wirken. Da aber bestimmte virale Vektoren die Infektion von Leberzellen und anschließende Expression von shRNAs in unnatürlich hoher Konzentration ermöglichen, kann es hierbei zu Komplikationen kommen⁹, die bei einem normalen siRNA-

Therapieansatz nicht zu erwarten sind. Da shRNAs im Zellkern produziert werden, erfolgt deren Ausschleusen in das Cytoplasma auf demselben Weg wie die Bereitstellung der zelleigenen microRNAs. Es ist denkbar, daß durch drastische Überlastung von Transportfaktoren, wie etwa von Exportin 5, mit künstlichen shRNAs Störungen im microRNA-Metabolismus auftreten, die schließlich toxisch sind. Bei Verabreichen synthetischer siRNA wurden solche Effekte bisher nicht beobachtet und sind auch nicht zu erwarten.

siRNA Delivery

Eine Reihe von Anforderungen, die an ein Medikament gestellt werden, sind für siRNAs bereits erfüllt. Es können siRNAs entworfen und hergestellt werden, die äußerst effizient die Genexpression hemmen und im Organismus hinreichend stabil sind. Es ist auch prinzipiell kein Problem, siRNAs zu selektieren, die sehr spezifisch die Ziel-mRNA treffen und eine wenig ausgeprägte oder keine immunstimulatorische Wirkung zeigen. Um jedoch als Medikament geeignet zu sein, müssen siRNAs an den Ort der Krankheitsentstehung gelangen – also in das Gewebe, das die krankheitsverursachenden Proteine produziert. Des weiteren muß gewährleistet sein, daß die siRNA in das Cytoplasma der Zielzellen gelangt und nicht in Endosomen abgefangen wird. In

den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die zum Teil sehr erfolgreich waren und hoffen lassen, daß das Delivery-Problem für eine Reihe von siRNA-Applikationen bald gelöst werden kann⁶. Wissenschaftler von Alnylam bauen derzeit systematisch eine Delivery-Plattform auf und glauben, so ein für jede Indikation geeignetes Delivery-System zu finden.

Es gibt prinzipiell zwei verschiedene Verabreichungs-Routen für Wirkstoffe, die auch für siRNAs zutreffen, nämlich die direkte, lokale Administration in das kranke Organ oder die systemische Administration, wobei der Wirkstoff über die Blutbahn zum Zielort gelangt.

Insbesondere bei der lokalen Administration in die Lunge konnten bereits Erfolge erzielt werden¹⁰. Im Rahmen des Programms zur Entwicklung eines RNAi-Medikaments gegen eine virale Lungeninfektion, verursacht durch das Respiratory Syncytial Virus (RSV), wurden bei Alnylam optimierte siRNA-Moleküle intranasal verabreicht. Die mit RSV infizierten Bronchialepithelzellen liegen an der Oberfläche und sind gut zugänglich für eine siRNA (Abb. 2). Im Mausmodell konnte der RS-Virustiter durch einmalige Gabe von 4 mg/kg siRNA um bis zu vier Größenordnungen reduziert werden¹¹. Die siRNA war sowohl bei der Prävention als auch zur Behandlung einer bereits bestehenden RSV-Infektion äußerst wirksam. Neben der Virusreduktion kam es zur Verbesserung des pathologischen Bildes der Erkrankung, was anhand von Parametern wie Atmungsrate, Leukotrien-Induktion und Entzündungsreaktion gezeigt werden konnte. Das Medikament befindet sich inzwischen in der klinischen Prüfung (siehe unten).

Auch bei der systemischen Verabreichung von siRNAs gibt es erfolgreiche Ansätze. Alnylam gelang es durch Konjugation mit einer lipophilen Cholesterin-Gruppe die Aufnahme der siRNA in bestimmte Organe zu verbessern³. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Expression von Apolipoprotein B (ApoB) durch die intravenöse Gabe modifizierter siRNA bei Mäusen deutlich reduzieren läßt. Die Injektion von 50 mg/kg mit Cholesterin konjugierter siRNA an drei aufeinanderfolgenden Tagen reduzierte die apoB-mRNA in der Leber um 57% und im Dünndarm um 73%. Dies sind die Organe, in denen apoB vorwiegend exprimiert wird. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, daß die mRNA tatsächlich an der erwarteten Stelle gespalten wurde. Dies beweist, daß es sich hierbei um einen durch RNAi vermittelten Effekt handelt. Infolge der mRNA-Reduktion konnte eine Verminderung des ApoB-Proteins im Plasma um 68% beobachtet werden. Therapeutisch höchst relevant ist die damit einhergehende Senkung des gesamten Cholesterinspiegels um 37%.

Eine weitere Verbesserung dieses systemischen RNAi-Ansatzes konnte durch Formulierung der siRNAs mit kationischen Lipiden (Abb. 3) erreicht werden⁴. Die Hemmung der apoB-Expression nach einmaliger Gabe von 2,5 mg/kg mit Liposomen formulierten siRNAs (Stable Nucleic Acid Lipid Particles) war im Nagermodell noch stärker als bei höheren Dosen Cholesterin-konjugierter siRNAs.

Besonders bedeutend sind die Erfolge mit kationischen Liposomen als siRNA-Carrier bei Primaten⁴. Eine einmalige Dosierung von 2,5 mg/kg reduzierte das apoB-mRNA-Niveau in der Leber von Cynomolgus-Affen um 90%. Wie bei den Mausstudien wurde auch hier das Serumcholesterin deutlich reduziert. Während das Gesamtcholesterin um 65% gesenkt werden konnte, war eine Reduktion der LDL-Konzentration um 85% zu messen. Darüber hinaus hielt der Effekt für mindestens 11 Tage an. Die Behandlung wurde offensichtlich gut vertragen; lediglich einige Leberwerte waren vorübergehend erhöht.

Klinische Prüfung von RNAi-Medikamenten

Schon wenige Jahre nach der Entdeckung der RNAi konnten erste Wirkstoffe in klinischen Prüfung untersucht werden. Bei allen bisher durchgeführten klinischen Studien zeigte

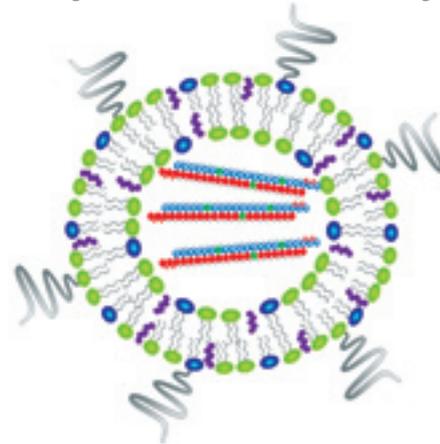


Abb. 3: Schema eines Stable Nucleic Acid Lipid Particle (SNALP) mit integrierten siRNAs.

sich, daß der siRNA-Wirkstoff gut vertragen wird und sicher ist. Vorreiter unter den RNAi-Medikamenten in der Klinik sind Therapeutika zur Behandlung der feuchten Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), wobei nackte siRNA lokal ins Auge gespritzt wird. Ziel der siRNA-Behandlung sind Gene aus dem VEGF-Stoffwechselweg, deren Beteiligung an der Krankheitsentstehung sehr gut validiert ist. In einer Phase-I-Studie wurde eine Stabilisierung der Sehkraft bei einem Teil der Patienten beobachtet, während in einer Phase-II-Studie mit Patienten, die unter schwerer, fortschreitender Makuladegenera-

tion litten, eine Reduktion der Läsionen und eine Verbesserung des Nahsehens beobachtet wurde.

In die weltweit erste Phase-I-Studie mit einem antiviralen siRNA-Therapeutikum wurden mehr als 100 Freiwillige einbezogen. Man zielte mit dem Wirkstoff ALN-RSV01 direkt auf das Humane Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) zur Behandlung der viralen Infektion. Es handelte sich hierbei um eine Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie, bei der der Wirkstoff ALN-RSV01 65 Personen intranasal verabreicht wurde. Sowohl einmalig verabreichte, ansteigende Dosen (5, 25 oder 150 mg) als auch mehrfach verabreichte, ansteigende Dosen (5, 25 und 150 mg) mit täglicher Anwendung über fünf Tage hinweg wurden an Freiwilligen getestet. ALN-RSV01 wurde ähnlich dem Placebo sehr gut vertragen. Mitte Oktober wurde eine weitere Studie begonnen, bei der ALN-RSV01 mittels eines Zerstäubers in feinste Tröpfchen verteilt, vom Studienteilnehmer inhaliert wird. Da sich mehrere Firmen mit der Entwicklung von RNAi-Therapeutika beschäftigen, werden wahrscheinlich in Kürze klinische Prüfungen mit weiteren siRNA-Medikamenten folgen.

Fazit

Bei der Entwicklung von RNAi-Therapeutika wurden in kurzer Zeit große Fortschritte erzielt. Die größte Herausforderung für eine breite Anwendung besteht darin, geeignete Delivery-Methoden für diese neuen Medikamente zu finden. Wenn auch dieses Problem nicht für alle Zelltypen und Organe gelöst ist, gibt es doch schon eine Reihe vielversprechender Ansätze, wie die Verwendung von Konjugaten und Lipiden. Die bisherigen klinischen Prüfungen zeigten, daß RNAi-Medikamente gut vertragen werden und sicher sind.

Literatur

- [1] Fire, A. et al., *Nature* 391 (1998) 806
- [2] Novina, C.D. und Sharp, P.A., *Nature* 430 (2004) 161
- [3] Soutschek, J. et al., *Nature* 432 (2004) 173
- [4] Zimmermann, T.S. et al., *Nature* 441 (2006) 111
- [5] Pei, Y. und Tuschl, T., *Nat. Methods* 3 (2006) 670
- [6] Dykxhoorn, D.M. und Lieberman, J., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 377
- [7] Fedorov, Y. et al., *RNA* 12 (2006) 1188
- [8] Marques, J.T. und Williams, B.R., *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1399
- [9] Grimm, D. et al., *Nature* 441 (2006) 537
- [10] Bitko, V. et al., *Nat. Med.* 11 (2005) 50
- [11] de Fougères, A. et al., *RNA interference in vivo: towards synthetic siRNA based therapeutics*, in Rossi, J., und Engelke, D.R. (Eds.), *RNA interference*, Academic Press, Amsterdam, 2005, 278

Korrespondenzadresse

Dr. Roland Kreutzer
Alnylam Europe AG
Fritz-Hornschuch-Str. 9
D-95326 Kulmbach
Tel.: +49-(0)9221-8276211
eMail: rkreutzer@alnylam.de

PCR-Kits

Fast Cycling PCR – höherer Durchsatz durch Zeitersparnis

Ulla Deutsch, Dirk Loeffert, QIAGEN GmbH, Hilden

Die Ansprüche der Wissenschaft an die Sensitivität, den Durchsatz und die Vereinheitlichung der Ergebnisse aus der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die heute in nahezu allen molekularbiologisch arbeitenden Labors praktiziert wird, nehmen rasant zu. Die von Qiagen entwickelte „Fast Cycling PCR“-Technologie eröffnet neue Möglichkeiten, diesen Ansprüchen gerecht zu werden. Die Technologie verkürzt die benötigte Zeit für die Durchführung der PCR deutlich, wie der jetzt auf den Markt gebrachte Fast Cycling PCR-Kit belegt, mit dem Qiagen zunächst auf Standard PCR-Anwendungen abzielt. Der Kit ist geeignet, um ausgehend von komplexen genomischen DNA- oder cDNA-Proben exzellente Ergebnisse zu erzielen. Der Fast Cycling PCR-Kit verkürzt die PCR-Zyklus-Zeiten und erspart so bis zu 75% der bisher benötigten Zeit. Der Kit ist mit allen marktüblichen Thermocyclern kompatibel und kann – im Gegensatz zu anderen Reagenzien – mit allen existierenden PCR-Assays angewandt werden, ohne daß Primer neu designed oder Annealing-Temperaturen angepaßt werden müßten. Dies ermöglicht einen erhöhten Durchsatz mit bereits vorhandener Labor-Ausrüstung sowie auf existierenden PCR-Systemen und vermeidet Investitionen für schnellere PCR-Instrumente.

Seit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary Mullis und seine Mitarbeiter vor mehr als 20 Jahren haben die Einsatzbereiche für PCR-Anwendungen rapide zugenommen. PCR wird heute routinemäßig in zahlreichen Forschungsbereichen eingesetzt. Beispiele dafür sind etwa der Biomarkernachweis, die Genregulation und die Krebsforschung (Abb. 1). Mit der Zunahme der PCR-Anwendungsfelder in Forschung und Routine sind aber auch die Anforderungen an die Technik selbst gestiegen. Zunehmend verlangen Wissenschaftler nach einem höheren Probendurchsatz bei gleichzeitiger Kostenminimierung, einer erhöhten Sensitivität sowie einer zuverlässigen Standardisierung der Daten. Auch die Entwicklung und Evaluierung neuer PCR-Assays, deren Reproduzierbarkeit und die

Verkürzung der PCR-Zeit bis zum Vorliegen der Ergebnisse unterliegen heutzutage besonderen Anforderungen.

Um die vielschichtigen Forschungsbedürfnisse zufriedenzustellen, muß jeder Schritt des experimentellen Ablaufs optimiert werden – von der Probenentnahme und -stabilisierung über die Aufreinigung der Nukleinsäure bis zur Amplifizierung und Detektion. Qiagen bietet bereits für alle Schritte bewährte und im wissenschaftlichen Umfeld oft als Standard etablierte Technologien an. Einen möglichen Ansatz, den Durchsatz bei gleichzeitiger Kostenminimierung zu erhöhen, bietet die Steigerung der Geschwindigkeit der PCR-Reaktion. Erfolge wurden in jüngerer Zeit etwa durch die Entwicklung von Thermocyclern erreicht, die schnellere Heiz- und Kühlraten aufweisen. Noch um-

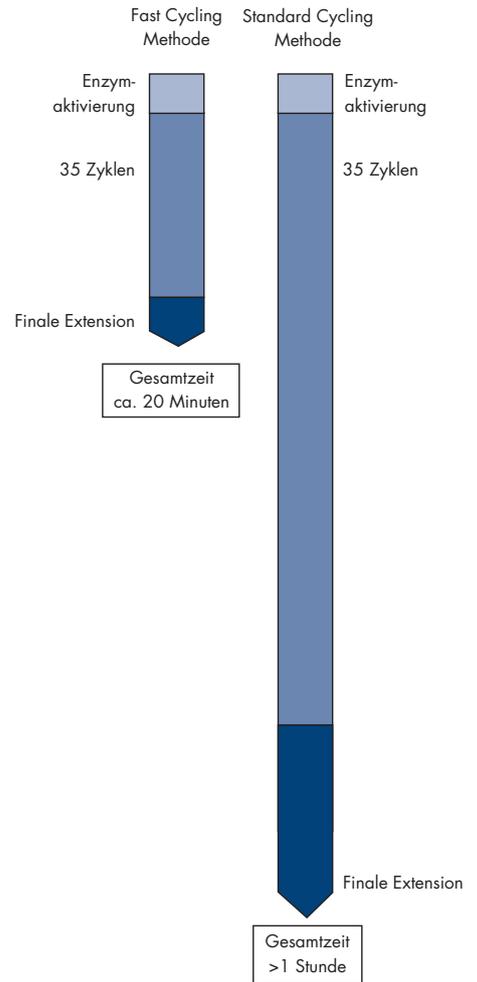


Abb. 2: Zeitreduktion durch den Qiagen Fast Cycling PCR-Kit gegenüber herkömmlicher PCR.

fangreichere Möglichkeiten zur Zeitersparnis bietet die Reduktion der PCR-Zyklusgeschwindigkeit, also die PCR-Chemie selbst. Denn diese macht den weitaus größten Teil der Zeit aus, die für die PCR-Amplifikation benötigt wird.

Bereits 1990 wurden von Garling et al. erfolgreich Ansätze zur „Fast Cycling PCR“ etabliert, die jedoch auf Anwendung von sehr kleinen Volumina in Glaskapillaren beschränkt waren^{1,2}. Damit wurde zwar der verbesserte thermische Transfer erzielt, der für ein Fast Cycling unerlässlich ist, doch erforderte das Verfahren spezifische Temperaturbedingungen und Instrumente.

Kürzere Analysezeiten

Um das Fast Cycling zu vereinfachen, hat Qiagen sich darauf konzentriert, die Dauer der PCR-Zyklen zu reduzieren. Ziel dabei war es, schneller die gleiche Anzahl von Daten-Punkten zu generieren, ohne spezielle Thermocycler einsetzen zu müssen. Ergebnis der Entwicklungsarbeit ist die sogenannte Fast Cycling PCR-Technologie, die neben der deutlichen Durchsatz-Erhöhung auch Zuverlässigkeit und eine hohe Spezifität der

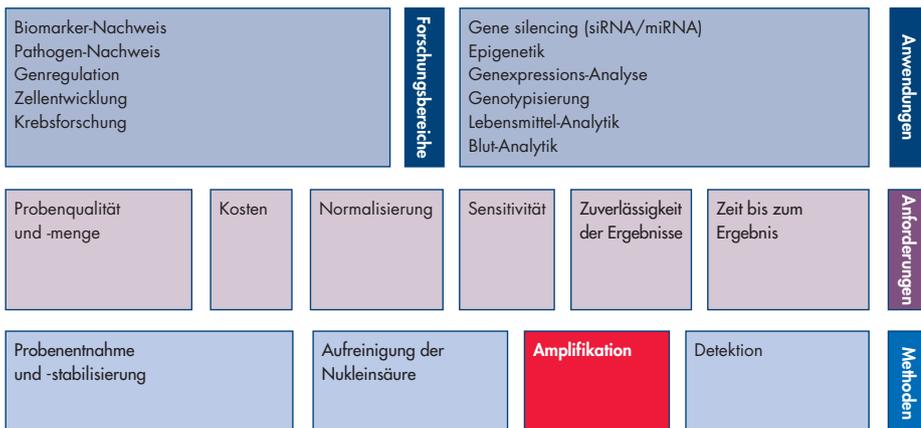


Abb. 1: PCR-relevante Forschungsbereiche

PCR-Reaktion gewährleistet. Dieser Beitrag beschreibt die Fast Cycling PCR-Technologie und dokumentiert damit verbundene Vorteile. Eine Technologie, die die Dauer der PCR-Zyklen verringert, bietet den Laboren bedeutende Vorteile. Sie erlaubt einen höheren PCR-Durchsatz, verbunden mit zuverlässigen Daten, was dem Wissenschaftler erlaubt, sich weitgehend auf die nachfolgende Analyse konzentrieren zu können. Sowohl laufende Kosten werden verringert als auch Kapitalanlagen vermieden, da mehr Proben auf jedem Thermocycler in gleicher Zeiteinheit analysiert werden können.

Der Kit nutzt eine sehr schnelle Hot-Start-PCR, die je nach Fragment-Länge eine Zeitersparnis von bis zu 75% bietet (Abb. 4, Tab. 1). Diese wird durch Einsatz eines zum Patent angemeldeten PCR-Puffers erreicht, der die Zeit verkürzt, die zur Bildung des Polymerase-Primer-Proben-Komplexes gebraucht wird (Abb. 3). Dies erlaubt der Polymerase, die Primer bereits während des PCR-Annealing-Schrittes zu verlängern und verkürzt diesen daher in jedem PCR-Zyklus. Der Zeitbedarf für den Denaturierungs- und/oder Extensions-Schritt werden ebenfalls durch das Puffersystem und die optimierten Polymerase-Konzentrationen verringert. Die PCR-Amplifikations-Zeit kann so von mehr als 60 Minuten auf bis zu 20 Minuten verringert werden, so daß auf

Tab. 1: PCR Cycling-Zeiten auf Basis verschiedener Fragment-Längen.

Fragmentlänge	Qiagen Fast Cycling Methode (min)	Standard Cycling Methode (min)	Zeitersparnis
200 bp	15	68	78%
500 bp	20	68	71%
1000 bp	29	85	66%
3000 bp	63	155	59%

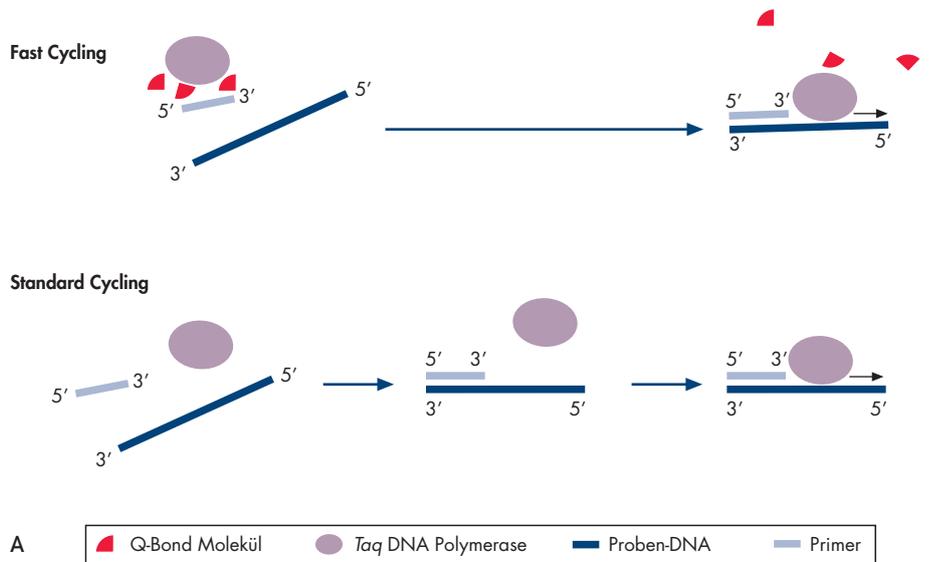


Abb. 3: A. Q-Bond im PCR-Puffer beschleunigt das Primer-Annealing durch Erhöhen der Affinität der Taq-DNA-Polymerase für kurze einzelsträngige DNA-Abschnitte. B. Ohne Q-Bond binden Primer und Polymerase zeitverzögert an die Proben-DNA und erhöhen die Dauer des Annealing-Schrittes.

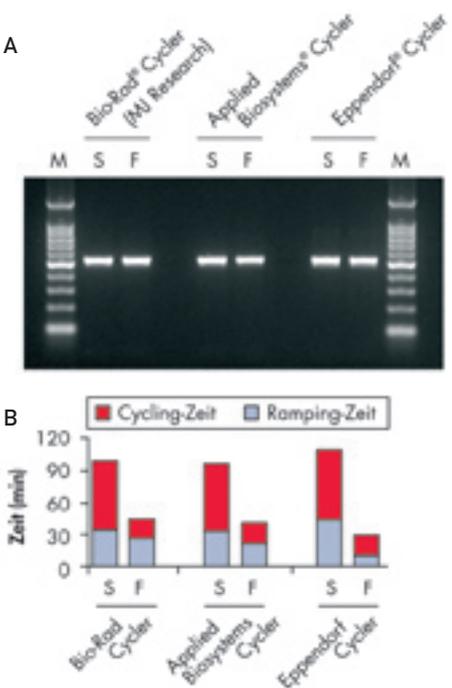


Abb. 4: Amplifikation eines 523 bp-Produkts mit (S) HotStarTaq Plus-DNA-Polymerase und auf Standard-Thermocyclern: (F) dem Qiagen-Fast Cycling PCR-Kit und Thermocyclern mit schnellen Ramping-Zeiten. A. Beide Methoden bieten eine effiziente und hochspezifische Amplifikation. B. Der Qiagen Fast Cycling PCR-Kit führt zu einer Zeitersparnis von bis zu 75%.

den neuesten Thermocyclern mit beschleunigten Heiz- und Kühlraten eine Gesamt-PCR-Zeit (bei 35 Zyklen) von etwa nur 30 Minuten erreicht wird (Abb. 4).

Neben der Gesamt-Zeitersparnis wird ebenfalls die Hands-on-Zeit verringert. Der Kit beinhaltet HotStarTaq® Plus-DNA-Polymerase in einem gebrauchsfertigen Master-Mix Format, das hohe Spezifität und Sensitivität gewährleistet und ein Ansetzen der PCR-Reaktion bei Raumtemperatur erlaubt. Die besonders ausgewogene Kombination der Ionen im Master-Mix ermöglicht darüber hinaus, daß bereits etablierte PCR-Systeme adaptiert werden können, ohne daß Primer neu entwickelt oder optimiert werden müssen. Gleichzeitig wird aber auch eine hohe PCR-Spezifität erreicht, die sonst oft unter Fast Cycling-Bedingungen beeinträchtigt ist. Zusätzlich enthält der Kit eine Farbstoff-Kombination, die es erlaubt, die PCR-Reaktion direkt, also ohne weiteres Handling auf ein Agarosegel aufzutragen.

Qiagen entwickelt derzeit Real-Time-PCR und RT-PCR-Kits, die auf der Technologie der Fast Cycling PCR-Kits basieren. Ziel ist es, extrem schnelle Real-Time-Analysen auf jedem Real-Time-Cycler anzubieten.

Fazit

Die von Qiagen entwickelte Fast Cycling PCR-Technologie eröffnet neue Möglichkei-

ten der großen Zeit- und Kostenersparnis bei erweiterter Nutzung der bisherigen Ausstattung und könnte sich als neuer Standard für Geschwindigkeit und Präzision in der PCR etablieren. Der Qiagen Fast Cycling PCR-Kit erhöht den PCR-Durchsatz deutlich, reduziert Kosten, liefert hochspezifische und sensitive Ergebnisse und verlangt dabei nur eine extrem geringe Optimierung. Der Kit wird in einem Master-Mix-Format geliefert, der ein Ansetzen der PCR-Reaktion bei Raumtemperatur erlaubt und die Hands-on-Zeit reduziert. In Zukunft wird Qiagen die Produktpalette um Fast Cycling PCR-Kits für Real-Time-PCR und RT-PCR erweitern, die mit allen Real-Time-Thermocyclern kompatibel sein werden.

Literatur

[1] Wittwer, C.T., Fillmore, G.C., Garling, D.J., Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples, *Anal. Biochem.* 186(2) (1990), 328-331.
 [2] Wittwer, C.T., Garling, D.J., Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization, *Biotechniques* 10(1) (1991), 76-83.

Korrespondenzadresse

Dr. Ulla Deutsch
 Qiagen GmbH
 Qiagen-Straße 1, 40724 Hilden
 Tel.: +49-(0)2103-29-16313
 Fax: +49-(0)2103-29-26313
 eMail: ulla.deutsch@qiagen.com

Marktübersicht: PCR-Kits

Molekularbiologische Forschung ohne PCR ist heute kaum mehr denkbar. Die Vielfalt entsprechender Kits, diverser Polymerasen und Assays für den Pathogennachweis sowie Kits zur Beschleunigung der Hybridisierung und zur PCR-Optimierung nimmt daher mit wachsendem Kenntnisstand über Schlüssel-moleküle stetig zu. Informationen über die aktuellen Produktlinien gibt die folgende Marktübersicht.

1. Firmenname, Ansprechpartner	Applied Biosystems Aptera Deutschland GmbH Frankfurter Straße 129 B 64293 Darmstadt Tel.: +49-(0)6151-9670-0 Fax: +49-(0)6151-9670-5599 address@eur.appliedbiosystems.com	Beckman Coulter GmbH 47807 Krefeld Europark Fichtenrain B13 Tel.: +49-(0)2151-333-425 Ansprechpartner: Dr. Rene Gödde	
2. Produktbezeichnung	AmpliQ [®] Gold DNA Polymerase mit GeneAmp [®] 10X PCR Gold Buffer	GeXP	SNPstart-Kit
3. Anwendungsbereiche	Hot-start PCR („research only“)	Kit zur hocheffizienten PCR-Aufreinigung auf Basis der SPRI-Technologie mit magnetischen Beads („research only“)	Kit zur kapillarelektrophoretischen Typisierung für bis zu 10 SNPs in einer Multiplex-PCR („research only“)
4. optimiert für ...	Applied Biosystems Thermal Cyclers	Beckman Coulter CEQ 8000 & 8800 + beliebiger Thermocycler	Beckman Coulter CEQ 8000 & 8800 + beliebiger Thermocycler
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	Enzyme, komplette Puffer, in unterschiedlichen Größen erhältlich von 200 bis 20.000 Reaktionen	100 Reactions	Single Tube: 100 Reactions
6. Polymerase-Eigenschaften	Original hot-start-Enzyme, gute Prozessivität, Aktivierung zum optimalen Zeitpunkt nach dem hot-start für eine bessere Spezifität, lange Halbwertszeit unter Cycling-Bedingungen	Thermo-Start [®] DNA Polymerase with separate 25 mM MgCl ₂ (AB-gene 0908)	
7. Nachweispezifität (%)	Falscher Einbau „Misincorporation Rate“: 1 Base auf 2.000 (0,05%)	95%	95%
8. Sensitivität (Kopien/Targetsequenz)	AmpliQ [®] Gold wird erfolgreich in der low-copy-PCR eingesetzt	Erhöht durch die Fähigkeit des Einsatzes bei 48 °C	1-100 fmoles einsetzbar im Bereich von 100 bp bis 40kb
9. Quantifizierung	AmpliQ [®] Gold wird als Basis für quantitative Real-Time-PCR eingesetzt	vielfach größere Effektivität der Amplifikation der GAPDH-Transkription als der beste Wettbewerber	nein
10. Multiplexing/Farbstoffe	Multiplexing AmpliQ [®] Gold wird erfolgreich für high-level-Multiplex-Anwendungen wie die MLPA-Technik eingesetzt.	bis zu 30x Multiplex möglich mit 1 Farbstoff	10x Multiplex möglich mit 3 versch. Farbstoffen
11. Zahl Pipettierschritte	Einsatz einer einzigen vorgemischten Reaktionslösung	Minimale Anzahl von Pipettierschritten	max. 10
12. zertifiziert/lizenziert für	AmpliQ [®] Gold wurde vor allem für forensische und klinische Untersuchungen eingesetzt, gemäß der internen Validierung der in diesen Feldern tätigen Gruppen	Nur für Forschungszwecke zugelassen	
13. Besonderheiten	Hot-start DNA-Polymerase auf die in der wissenschaftlichen Literatur weltweit am häufigsten verwiesen wird	Quantitative cDNA-Produktion für eine große Bandbreite von mRNA Ausgangskonzentrationen	selbst Produkte von 100bp können mit sehr guter Ausbeute aufgereinigt werden
14. Preis (Euro)	abhängig von Anwendung		

1. Firmendaten, Ansprechpartner	<p>Biomol GmbH Waldmannstr. 35, 22769 Hamburg Tel.: +49-(0)40-853260-0 Fax: +49-(0)40-853260-22 info@biomol.de www.biomol.de Ansprechpartner: Dr. Edgar Lipsius Tel.: +49-(0)40-853260-37</p>	<p>Bio-Rad Laboratories GmbH Heidemannstr. 16 80939 München Dr. Claudia Tengler www.bio-rad.com</p>	<p>Reverse Transcription Reagents iScript one-step RT-PCR Kit with SYBR Green</p>
2. Produktbezeichnung	SuperArray RT2 Profiler PCR Arrays	Real-Time-PCR-Kits Lebensmitteldiagnostik: iQ-Chek™ Salmonella spp. • iQ-Chek™ Listeria monocytogenes	Reverse Transkription von RNA in cDNA und Amplifikation in einem Schritt. Kein Umpipettieren der cDNA erforderlich. SYBR Green ermöglicht den quantitativen Nachweis mittels Real-Time-PCR
3. Anwendungsgebiete	simultane Genexpressionsanalyse unterschiedlicher Gene mithilfe der Real-Time-PCR im 96-Well-Format. research only	Gebrauchsfertige Real-Time-PCR-Kits zum qualitativen Nachweis von Salmonella spp. und L. monocytogenes in Lebensmitteln und Umweltproben	geringe Kopienzahl • komplexe Templates • hohe lineare Umschreiftreffizienz für niedrige bis hohe RNA-Mengen
4. optimiert für...	verschiedene PCR-Array-Formate und Master-Mixe erhältlich, optimiert für diverse Real-Time-PCR-Instrumente	• für das Chromo4 Multicolor Real-Time PCR Detection System • für das iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	vorformulierter iScript Mastermix mit einer Mischung aus Enzym und spez. Pufferkomponenten plus SYBR Green für die quantitative Real-Time-PCR
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	a) 2-PCR-Array-Set oder 12-PCR-Array-Set (2 x 96 Wells oder 12 x 96 Wells) b) Reaction Ready First Strand cDNA Synthesis Kit (reicht für 12 PCR Arrays) c) RT2 Real-Time PCR Master Mix (für 200 oder 2000 Reaktionen)	ausreichend für 96 PCR-Ansätze: Lysispuffer für die DNA-Extraktion; Amplifikationsmix; Sondenmix, Positiv- und Negativkontrolle	
6. Polymerase-Eigenschaften	durch chemische Modifikation inaktivierte Hot-Start-Polymerase, hohe Amplifikationsrate, in Kombination mit SuperArray-Master-Mix (s. 5. c): keine Primer-Dimere u. a. unspezifische Produkte		
7. Nachweispezifität (%)	experimentell verifizierter Computer-Algorithmus beim Primer-Design gewährleistet Gen-spezifische Amplifikation; garantiert nur ein Amplicon pro Well in Verbindung mit den o.g. SuperArray-Kits (s. 5. b/c)	relative Spezifität für iQ-Chek L. monocytogenes: 98,8 % • relative Spezifität für iQ-Chek Salmonella spp: 100 %	hohe Spezifität für total-RNA-Umschreibung von cDNA >4kb
8. Sensitivität (Kopien/Targetsequenz)	hohe Sensitivität. Expressionsanalyse möglich mit nur wenig Ausgangsmaterial, ab 50 ng Gesamt-RNA	iQ-Chek L. monocytogenes: 0,2 bis 1,4 KBE / 25 g oder 25 ml der Probe • iQ-Chek Salmonella spp: 0,3 bis 2,2 KBE / 25 g oder 25 ml der Probe	bis zu 1 pg total RNA
9. Quantifizierung	relative Quantifizierung der Genexpression anhand der $\Delta\Delta Ct$ -Methode	Nein	großer dynamischer Quantifizierungsbereich 100ng-1pg HeLa cell total RNA. • Extrem sensitiv • bis zum Nachweis von 100 fg RNA
10. Multiplexing/Farbstoffe	SYBR Green-Nachweis; reproduzierbare Ergebnisse über einen breiten dynamischen Konzentrationsbereich (mind. 5 Log-Stufen), kein Multiplexing	Ja • Farbstoffe: FAM u. TexasRed • je 1 Farbstoff für den spezif. Nachweis des Pathogens; 2. Farbstoff für Nachweis d. internen Kontrolle	siehe unter „quantitativer Nachweis“ Farbstoffe: SYBR-Green
11. Zahl Pipettierschritte	wenig Pipettierschritte, zügiges Protokoll	4 Schritte o. DNA-Extraktion	2-5
12. zertifiziert/licenziiert für		Validierte Real-Time-PCR-Kits: iQ-Chek Salmonella spp: AFNOR-Validierung gemäß ISO 16140, NordVal-Validierung • iQ-Chek Listeria monocytogenes: AFNOR-Validierung gemäß 16140	for research use only
13. Besonderheiten	• Pathway- oder Krankheits-spezifisches Genexpression-Profil-ling • kundenspezifische Zusammenstellung von Genen ebenfalls möglich (Custom PCR Arrays) • hohe Sensitivität und breiter dynamischer Bereich • Primer-Paare sind nach experimentell verifizierten Computer-Algorithmus gefertigt	Lysisreagenz für die DNA-Extraktion ist in den Kits mitenthalten; Inhibitionskontrolle für jeden Ansatz für valide negative Ergebnisse	Enzym hat RNase H-Aktivität • Puffer enthält RNase-Inhibitor
14. Preis (Euro)	a) 2-PCR-Array-Set: 630 €; 12-Array-Set: 1.680 € • b) Reaction Ready First Strand cDNA Synthesis Kit: 210 € • c) RT2 Real-Time PCR Master Mix: für 200 Reaktionen: 237 € • für 2.000 Reaktionen: 1.679 €	100x50µl RXN • 500x50µl RXN • 1000x50µl RXN • 2000x50µl RXN	50x20µl RXN 1200x20µl RXN

1. Firmendaten, Ansprechpartner	Cambrex Bio Science Tel.: 0800-102 52 87 Fax: 0800 102 52 79 (toll free) info.europe@cambrrex.com	GE Healthcare LifeSciences Oskar-Schlemmer-Str. 11 80807 München Dr. Petra Galgóczy, Technical Support Tel.: +49-089-96281-660	Genekam Biotechnology AG Damm Str. 31-33 47119 Duisburg Tel.: +49-0203-555059-31 Fax: +49-0203-358299 www.genekam.de query@genekam.de Ansprechpartner: Michael Ullie	Minerva Biolabs GmbH Königscker Straße 325, 12555 Berlin Tel.: +49-030-30-4576 2830 Fax: +49-030-4576 2831 info@minerva-biolabs.com www.minerva-biolabs.com Ansprechpartner: Dr. Marc Bäuerle
2. Produktbezeichnung	Takara Perfect Real-time PCR Premix kits	illustra Hot Start Mix RTG 0.5 ml 100 Reaction Pack • 0.2ml 5x Reaction Pack • 0.2 ml 5x96 Reaction Pack	Ready to use PCR Salmoneilla sp.: Gel Agarose: 100 Reactions	Onar [®] Lp-QP- real-time PCR Assay für den Nachweis von Legionella pneumophila
3. Anwendungsgebiete	For PCR and Real-time PCR in research and diagnostics	Hot Start PCR For research use only	Lebensmittel	Onar [®] Lp ist ein in-vitro-Diagnostikum für den qualitativen oder quantitativen Nachweis von <i>Legionella pneumophila</i> (bzw. Onar [®] Ls für <i>Legionella</i> spp) in klinischem Probenmaterial.
4. optimiert für...	Can be used on all regular or Real-time PCR instrumentation	Thermocycler für: 0.5 und 0.2 ml Standardreaktionsgefäße	optimiert für alle Thermocycler	ABI Prism 7500, RotorGene, LightCycler, etc.
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	Add template and primers to the PCR premix	Reaktionstubes enthalten den vollständigen Reaktionsansatz in Form von bei RT lagerbaren Beads. Die Beads bestehen aus Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Magnesium, Puffer, Stabilisatoren und Hot Start Activator-Protein. Für einen Ansatz muß lediglich Wasser, Primer und Template zugegeben werden.	Polymerase, Leiter, Nucleotide, PCR Master Mix, Positiv-Kontrolle, Negativ-Kontrolle, Anleitung	10x Reaction Buffer, Primer/Probe/Nucleotide Mix, Internal Control DNA, Internal Control Probe
6. Polymerase-Eigenschaften	High sensitivity, optimized for real-time PCR, excellent linear range	Rekombinante PuRe-Taq-DNA-Polymerase bei Raumtemperatur lagerbar, thermostabil, unempfindlich gegenüber längeren Erhitzungsschritten	Polymerase	Holstart MB Taq-DNA-Polymerase sorgt für unübertroffene Sensitivität.
7. Nachweispezifität (%)	product contains hot start enzymes, ensuring the highest specificity		99%	100%
8. Sensitivität (Kopien/Fargesequenz)	Excellent sensitivity because of Takara's patented LA (Long and Accurate) technology		10 Genome per Reaktion	Nachweisgrenze liegt bei 5 Genomkopien/ Test
9. Quantifizierung			Singlex	Quantifizierungslimit beträgt 25 Genomkopien/ Test.
10. Multiplexing/Farbstoffe				Die verwendete Scorpions [™] Technologie (FAM) ermöglicht einen dynamischen Meßbereich von 25 – 2.300.000 Genomkopien/ Test.
11. Zahl Pipettierschritte		Zugabe von Wasser, Primer und Template PCR in LS research	2	3 Pipettierschritte
12. zertifiziert/lizenziert für		Primer werden vor der Hitzeaktivierung durch HotStart Activator Protein zurückgehalten, sodas PuRe Taq Polymerase durch Entzug des Substrats in inaktivem Zustand gehalten. Ausbildung von Primer-Dimeren sowie unspezifischer Amplifizierung wird verhindert. Beads sind bei Raumtemperatur lagerbar.	Gensequenzierung Optional	Onar [®] Lp-QP bzw. Onar [®] Ls-QP sind CE-registriert und für die klinische Diagnostik zugelassen
13. Besonderheiten		0.5 ml 100 Reaction Pack: 116.00 € • 0.2ml 5x Reaction Pack: 116.00 € • 0.2 ml 5x96 Reaction Pack: 520.00 €	Gensequenzierung Optional	Einfachste Handhabung, gesicherte Reproduzierbarkeit, exzellente Linearität.
14. Preis (Euro)	Takara Perfect Real-time PCR Premix kit (with SYBR Green) 352.10 € • Takara Perfect Real-time PCR Premix kit (without SYBR Green) 242.76 €	0.5 ml 100 Reaction Pack: 161.00 € • 0.2ml 5x Reaction Pack: 149.00 € • 0.2 ml 5x96 Reaction Pack: 673.00 €	399,- € für 100 Tests	25 rxn: 224,- € 100 rxn: 807,- € 250 rxn: 1792,- €

1. Firmendaten, Ansprechpartner	<p>Minerva Biobabs GmbH Köpenicker Straße 325, 12555 Berlin Tel.: +49-(0)30-4576 2830 . Fax: +49-(0)30-4576 2831 info@minerva-biobabs.com . www.minerva-biobabs.com Ansprechpartner: Dr. Marc Bäuerle</p>	<p>New England Biolabs GmbH Brünningsstr. 50 Geb. 6810, 65926 Frankfurt Tel.: +49-69-305-23140, Fax +49-69-305-23149 Service call: Tel.: 0800-246-5227 (kostenfrei in D), Fax 0800-246-5229 (kostenfrei in D)</p>	<p>Phusion™ High-Fidelity HF/GC PCR Master Mix (von Finnzymes Oy) Extrem prozessive, genaue und gleichzeitig schnelle Amplifikation ZxMasterMix optimiert für höchste Genauigkeit (HF) oder schwierige Templates (GC) ZxMasterMix enthält bereits alle notwendigen Komponenten, d.h. es müssen nur noch Template, Wasser und Primer zugegeben werden ZxMasterMix enthält alle notwendigen Komponenten. Bei Quick-Load-Variante ist auch kein zusätzlicher Auftragspuffer mehr erforderlich</p>	<p>Promega GmbH Schlidtkrüstraße 15, 48199 Mannheim www.promega.com Dr. Uwe Mohr Tel.: +49-(0)621-9501-290, uwe.mohr@promega.com</p> <p>GoTaq® Green-Mastermix Plexor™ qPCR-System</p> <p>GoTaq® Green Mastermix: Routine PCR, Research und Diagnostic Plexor™ qPCR System: MultiPlex Real Time PCR</p> <p>GoTaq® Green Mastermix arbeitet auf allen bekannten Thermocyclern. Plexor™ qPCR System ist kompatibel zu vielen RealTime PCR Geräten. Liste unter: www.promega.com/techserv/apps/qpcr/instrumentation.htm</p> <p>GoTaq® Green Mastermix, System bestehend aus 100 oder 1000 Standard-PCR-Ansätzen, beinhaltet Polymerase, dNTPs und Reaktionspuffer im PreMix. • Plexor™ qPCR-System beinhaltet Polymerase, dNTPs und Reaktionspuffer im PreMix. Zusätzlich Positive Kontrolle für Reagenziencheck</p> <p>Hochsensitive native Polymerase, nicht rekombinant hergestellt</p> <p>Abhängig von dem Target und Gesamt-DNA-Konzentration</p> <p>< 10 Targets/Ansatz möglich</p> <p>Durch Multiplexing und gleichzeitige Schmelztemperaturanalyse sowohl quantitative Bestimmungen als auch relative Expression mit Referenzgenen möglich</p> <p>Plexor™ qPCR System Multiplexing mit 4 Farbstoffen möglich (nur Geräte limitiert) plus gleichzeitige Schmelztemperaturanalyse ohne weitere Farbstoffzugabe!</p> <p>Max. 3 Schritte, abhängig von der Applikation</p>
2. Produktbezeichnung	<p>Venor™ Mp-QP - real-time-PCR Assay für den Nachweis von <i>Mycoplasma pneumoniae</i></p>	<p>Realtime qPCR Kits „DYNAmo™“ des Herstellers Finnzymes Oy</p>	<p>Taq 2X Master Mix / Quick-Load™ Taq 2X Master Mix</p>	
3. Anwendungsgebiete	<p>Venor™ Mp ist ein in-vitro -Diagnostikum für den qualitativen oder quantitativen Nachweis von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> in klinischem Probenmaterial.</p>	<p>Realtime PCR Master Mixes (Kits) für optimale Performance</p>	<p>Höchste Reproduzierbarkeit der PCR durch Verwendung eines Zx Master Mix</p>	
4. optimiert für...	<p>ABI Prism 7500, RotorGene, LightCycler, etc.</p>	<p>Kits optimiert sowohl für für SYBR Green- und Probe-Chemie als auch für Kapillar- bzw. Block-Instrumente</p>		
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	<p>10x Reaction Buffer. • Primer/Probe/Nucleotide Mix • Internal Control DNA • Internal Control Probe.</p>	<p>Kits enthalten 2x Master Mixes mit allen notwendigen Komponenten, es müssen nur noch Template, Wasser und Primer zugegeben werden. 2 Packungsgrößen erhältlich (Kleine Packung = 100 rxn im 20 µl Maßstab)</p>	<p>ZxMasterMix enthält alle notwendigen Komponenten. Bei Quick-Load-Variante ist auch kein zusätzlicher Auftragspuffer mehr erforderlich</p>	
6. Polymerase-Eigenschaften	<p>Holsart MB Taq-DNA-Polymerase sorgt für unübertroffene Sensitivität</p>	<p>Als einzige Kits auf dem Markt nutzen die DYNAmo Kits keine „Standard“-Taq-Polymerase, sondern Hot Start Tbr Polymerase (bzw. Tbr-Fusion) f. bessere Performance u. höhere Thermostabilität. Kits z. T. auch als nicht-Hot Start-Variante erhältlich</p>	<p>Taq-DNA-Polymerase</p>	
7. Nachweispezifität (%)	<p>100%</p>	<p>Höchste Spezifität dank optimierter Kits</p>	<p>Hohes Spezifität durch optimierte Pufferbedingungen</p>	
8. Sensitivität (Kopien/Targetsequenz)	<p>Nachweisgrenze liegt bei 5 Genomkopien/Test</p>	<p>Höchste Sensitivität (von 1 bis 100.000 Kopien Template-DNA)</p>	<p>Höchste Sensitivität bei gleichzeitig größtmöglicher Reproduzierbarkeit</p>	
9. Quantifizierung	<p>Quantifizierungslimit beträgt 25 Genomkopien/Test</p>	<p>Bis zu eine Kopie an Template-DNA quantitativ nachweisbar</p>	<p>Semi-quantitativer Nachweis möglich</p>	
10. Multiplexing/Farbstoffe	<p>Die verwendete Scorpions™-Technologie (FAM) ermöglicht einen dynamischen Meßbereich von 25 bis 2.500.000 Genomkopien/Test.</p>	<p>Zur Normalisierung der Fluoreszenzsignale liegt einigen Kits der Farbstoff ROX als separates Tube bei</p>	<p>Gleichzeitige Amplifikation mehrerer Templates ist möglich</p>	
11. Zahl Pipettierschritte	<p>3 Pipettierschritte</p>	<p>4-5 (mit ROX) Pipettierschritte erforderlich</p>	<p>4 Pipettierschritte</p>	
12. zertifiziert/licenziiert für	<p>Venor™ Mp ist CE-registriert und für die klinische Diagnostik zugelassen.</p>	<p>Lizenziert für qPCR, research only</p>	<p>Research only</p>	<p>ISO9001_2000</p>
13. Besonderheiten	<p>Einfachste Handhabung, gesicherte Reproduzierbarkeit, exzellente Linearität.</p>	<p>qRT-PCR als 2-Step Kit mit 2x RT-Master Mix erhältlich – für optimale Ausbeute an cDNA und anschließende qPCR-Ergebnisse</p>	<p>Besonders schnell: Quick-Load™ Taq 2X Master Mix enthält Orange G und Xylene Cyanol FF – dadurch kann der PCR-Ansatz direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.</p>	<p>Plexor™: einfaches Multiplexing mit gleichzeitiger Schmelztemperaturanalyse</p>
14. Preis (Euro)	<p>25 rxn: 224,- € 100 rxn: 807,- € 250 rxn: 1792,- €</p>	<p>288,- € (200 Reaktionen, Block) • 600,- € (500 Reaktionen, Kapillar)</p>	<p>Ab 68,- € / 100 rxn, bzw. 272,- € / 500 rxn</p>	<p>GoTaq® Green Master Mix: 100 reactions 72 1000 reactions 566 € • Plexor™ qPCR System 200 reactions: 170 € • Plexor™ One-Step qRT-PCR System 200 reactions: 320 € • Plexor™ Two-Step qRT-PCR System 200 reactions: 320 €</p>

1. Firmendaten, Ansprechpartner	PromoCell GmbH Tel./Fax: +49-(0)6221-64934-0/-40 www.promokline.de, info@promokline.de Dr. Jürgen Becker	QIAGEN GmbH Technischer Service Tel.: +49-(0)2103-29-12400 www.qiagen.com	QIAGEN GmbH Technischer Service Tel.: +49-(0)2103-29-12400 www.qiagen.com	Roche Diagnostics GmbH Mannheim www.roche-applied-science.com Tel.: +49-(0)621-759 8568 mannheim.biocheminfo@roche.com	LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I
2. Produktbezeichnung	PCR Mycoplasma Detection Kit II	Quantitect Probe PCR Kit	Quantitect Green PCR Kit + Quantitect Primer Assays	FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack	Real Time PCR/ RT-PCR • Quantifizierung von DNA/cDNA-Fragmenten
3. Anwendungsgebiete	Mykoplasmen-Detektion in Zellkulturen (research use only)	Real-Time PCR mit sequenzspezifischen Sonden	Real-Time PCR mittels SYBR® Green I Detektion	Amplifikation genom. oder cDNA m. hoher Spezifität, Sensitivität u. Ausbeute • auch f. schwierige PCR-Anwen. • f. Pipettierroboter wg. HotStart	
4. optimiert für...	Thermocycler	Optimiert für alle Real-Time Cycler	Optimiert für Thermocycler	Optimiert für Thermocycler	Optimiert f. LightCycler® 1.5/2.0 Systeme
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	Kit besteht aus: Reaction-Mix (Primers, dNTPs, Taq-Polymerase), Buffer Solution, Positive Template Control, 20 PCR-Tests	Master Mix Format: 200 Reaktionen à 50 µl oder 1000 Reaktionen à 50 µl	Enzymmisch., PCR-Puffer mit u. ohne MgCl ₂ , MgCl ₂ , Stocklsg. DMSO. Nur bei dNTPacks, gebraucht 10 mM dNTP-Mix. • Packungsgr./Anz. Reaktionen: 125 units (50 Reakt. à 50 µl), 500 units (200 Reakt. à 50 µl), 2500 units (1000 Reakt. à 50 µl)	Enzym: PCR-Puffer mit und ohne MgCl ₂ , MgCl ₂ , Stocklösung, GC-reich dNTP-Mix • Packungsgrößen/Anz. Reaktionen: 100 units (50 Reakt.) bis 5000 units (2500 Reakt.)	Inhalt: LightCycler® FastStart Enzym, LightCycler® FastStart Reaktionsmix mit SYBR Green I PCR-grade Wasser Packungsgrößen/Anzahl Reaktionen: 96 Reaktionen (à 20 µl), 480 Reaktionen (à 20 µl)
6. Polymerase-Eigenschaften	rekombinante, qualitativ hochwertige Taq-Polymerase	Der Master Mix enthält: HotStarTaq-DNA-Polymerase, die sehr stringenten „hot start“ vermittelt und ein optimierter Puffer, der selektiv unpezifische Basenpaarung destabilisiert aber spezifische und effiziente Sondenhybridisierung unterstützt.	Hot Start Polymerase • Proofreading Aktivität • Amplifikate bis 5 kb • Effizienz, nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	Hot Start-Polymerase • Amplifikate bis 3 kb	Hot Start-Polymerase • Effiziente und reproduzierbare Amplifikation schwieriger Templates • Hohe Toleranz gegenüber PCR-Inhibitoren • Sehr robust besonders bei Schwankungen der Templatemenge und -qualität
7. Nachweispezifität (%)	detektiert hochspezifisch und sehr sensitiv: M. fermentans, M. hyorhinis, M. arginini, M. orale, M. salivarium, M. hominis, M. pulmonis, M. arthritis, M. bovis, M. pneumoniae, M. pirum und M. capricolum sowie verschiedene Acholeplasma- und Spiroplasma-Arten.	Sehr hohe Spezifität, abhängig von den eingesetzten Sonden	Quantitect Primer-Assays (genomweite Primer-Sets zur Verwendung mit SYBR Green I) garantieren höchste Spezifität	++++	Delektion doppelsträngiger DNA, Produktidentifikation erfolgt über sehr spezifische Schmelzpunktanalyse
8. Sensitivität (Kopien/Targetsequenz)	Sensitivität: 10-20 CFU/ml; Targetsequenz: konservierte, Mykoplasmen-spezifische 16S rRNA-Region	Nachweis von 10 Kopien möglich	Sensitivität: Nachweis von 10 Kopien möglich	++++	Delektion v. 10-10 ⁶ Kopien in < 30 Minuten. Unter optimalen Bedingungen kann ein single copy-Gen in 3 µg humaner genomischer DNA detektiert werden.
9. Quantifizierung	Ja, PCR Effizienz >90%	Ja, PCR Effizienz >90%	4fach höhere Genauigkeit als Taq-DNA-Polymerase	Genauigkeit vergleichbar mit Taq DNA Polymerase	Automatische Quantifizierung mit LightCycler® Relative Quantification Software
10. Multiplexing/Farbstoffe	Linearer Bereich: 10 – 10 ⁷ Kopien. Multiplexing (2-5 Gene) möglich mit speziell optimiertem Master Mix den Quantitect Multiplex PCR bzw RT-PCR Kits	Linearer Bereich: 10 – 10 ⁷ Kopien	Linearer Bereich: 10 – 10 ⁷ Kopien	Für Multiplex-PCR geeignet • TA-Klonierung	Linearer Bereich über 10 log-Stufen. Delektion doppelsträngiger DNA mit SYBR Green I bei 530 nm.
11. Zahl Pipettierschritte	4	3	3	Prokollie unter http://www.roche-applied-science.com/sis/amplification	Wenig Pipettierschritte d. optimale MgCl ₂ -Konz. • Prokollie unter www.roche-applied-science.com/sis/amplification • Pipettierschema kann angefordert werden
12. zertifiziert/lizenziert für	For research use only	For research use only	For research use only	For research use only	
13. Besonderheiten	schnell, einfach, zuverlässig, reproduzierbar; detektiert sehr spezifisch u. sensitiv die f. Zellkulturkontamin. verantwortlichen Mykoplasmen-Arten. Keine aufwändige Probenoberbereitung, PCR-Kit für Real-Time PCR ist ebenfalls erhältlich!	Auch als 1-Schritt RT-PCR Kit verfügbar	Garantierte Funktionalität für die Kombination von Quantitect Primer Assays mit Quantitect SYBR Green Kits.	auch als Master-Mix verfügbar • auch ohne dNTP-Mix erhältlich	Kein Sondendesign erforderlich • keine Zugabe von MgCl ₂ erforderlich • Amplifikation schwieriger Templates • robustes System
14. Preis (Euro)	120 €	200 Reaktionen = 522 € ; 1.000 Reaktionen = 2063 €. Testkit verfügbar auf Anfrage	Quantitect SYBR Green PCR Kit: 200 Reakt.: 422 € ; 1.000 Reakt.: 1.686 €. Testkit verfügb. auf Anfrage; Quantitect Primer Assays: 200 Reakt.: 62 €	80 € (125 units), 240 € (500 units), 1100 € (2500 units)	209 € (96 Reaktionen), 834.50 € (480 Reaktionen)

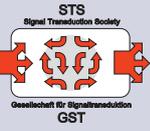
1. Firmendaten, Ansprechpartner	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstraße 5 82024 Taufkirchen Tel.: +49-(0)89-4513-0	USB Europe GmbH Hauptstraße 1, D.-79219 Staufen custserv@usbweb.de Tel.: +49-(0)76-39933400	Takara Bio Europe S.A.S. 2, avenue du président Kennedy, F-78100 Saint-Germain-en-Laye Tel./fax: +33-(0)1-390469-800-70 François-Xavier Sicut, Ph.D., François-Xavier.Sicut@takara-bio.eu/www.takara-bio.eu	USB Europe GmbH Hauptstraße 1, D.-79219 Staufen custserv@usbweb.de Tel.: +49-(0)76-39933400
2. Produktbezeichnung	Enhanced Avian HS RT-PCR kit	PrimeSTAR HS DNA Polymerase	PremixEx Taq™ with or without SYBR Green, 200 x 50µl reactions	RubyTaq™ PCR Master Mix (2x)
3. Anwendungsgebiete	Reverse transcriptase PCR	(for research only) Any application requiring High Fidelity PCR like cloning, protein expression...	Real Time PCR	FidelITaq™ PCR Master Mix (2x)
4. optimiert für...	Optimized for pellet and forced fluid thermocyclers (MJ and PE, respectively)	Any Thermal cycler	Most Real Time Thermal cyclers (ABI, Roche, Stratagene, Cepheid ...). Applicable to high-speed thermal cyclers.	
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	11 components: eAMV for increased transcription length, antibody hot start increases sensitivity	PrimeSTAR HS DNA Polymerase • 10x Buffer I and II for use depending on the annealing temperature of primers • Or special 10x GC buffer for use when amplifying high GC content DNA. • Ready to use dNTP mixture	2X concentrated premix including TaKaRa Ex Taq™ HS, specially formulated buffer for real-time PCR applications. Mg ²⁺ and dNTPs. With or without SYBR Green I for intercalating dye or probe detection method, respectively. • ROX reference dye I and II for normalization in most 96 wells instruments. • Or special 10x GC buffer for use when amplifying high GC content DNA.	100 reactions à 50 µl or 200 reactions à 25 µl • 4 x 625 µl RubyTaq PCR Master Mix, 2X
6. Polymerase-Eigenschaften	Enzyme has excellent processivity, good temperature stability	Two (2) components: MMLV Reverse Transcriptase, M1427, 10X M-MLV Reverse Transcriptase Buffer, B 8559. Offered as 800, 4000 reactions	Accuracy. One of the most accurate polymerase non the market due to incorporated proofreading activity. PrimeSTAR is at least 10 times more accurate than regular Taq. With GC buffer it is even able to go through difficult templates. Specificity. Thanks to the antibody mediated hot start. PrimeSTAR amplifies target DNA specifically. There is no need of enzyme activation step as the antibody is released from enzyme during the initial DNA denaturation step of PCR	ideal for high throughput • amplifies low-copy targets from complex templates • eliminates several pipetting steps • Tested User Friendly™
7. Nachweispezifität (%)	HSRT-100 is tested in PCR, specificity is verified by gel analysis of the product		Efficiency: The enzyme is able to amplify from minute amount of DNA and up to 8kbp. It outperforms most high fidelity enzymes on the market.	less primer-dimer and off-target formation
8. Sensitivität (Kopiert/Targetsequenz)	ca. 30 copies	ca. 30 copies	< 10 copies of target sequence	≤ 3 pg. detection of a single copy
9. Quantifizierung	not tested in quant. applications		Linear standard curve obtained over a broad range of template amount	4,35 x 10 ⁻³ mutations per base per duplication or 1 mutated base per 23.000 bases synthesized in one round
10. Multiplexing/Farbstoffe	not tested in multiplex applications		Multiplexing possible when using probes for detection. Accurate quantification of initial template obtained over a dynamic range of 7-8 orders of magnitude	yes
11. Zahl Pipettenschritte	4 + user supplied template/primers.		Convenient 2X Premix to be added to equal volume of template and primer solution. Addition of provided ROX I or II reference dye can be required depending on used instrument.	1
12. zertifiziert/izenziert für	Licensed for PCR	Licensed for PCR. Applicable to research use, environmental, food and animal testing.		PCR • ISO 9001:2000
13. Besonderheiten	Sensitivity and long transcripts for reverse transcriptase PCR	Enzyme has excellent processivity, good temperature stability		Dyes do not influence performance of amplification
14. Preis (Euro)	HSRT100-1KT-423 €	R9376-500UN: 140 € • R9376-1KU-302 €	Please inquire to Takara's distributors. List available at www.takara-bio.eu	83 €
		M1302-40KU: 246 50 € • M1302-200KU: 1050 €		108 €

1. Firmendaten, Ansprechpartner	USB Europe GmbH Hauptstraße 1 D-79219 Staufen custserv@usbweb.de Tel.: +49-(0)716-33933400
2. Produktbezeichnung	HotStart-IT™ Taq PCR Master Mix (2x)
3. Anwendungsgebiete	USB has combined high-quality USB Taq DNA Polymerase with a recombinant protein which binds and sequesters primers at lower temperatures making them unavailable for use by Taq DNA Polymerase. This primer-sequestration technique effectively blocks DNA synthesis from mis-priming events at lower temperatures. Following the initial denaturation step during PCR, the protein is inactivated & the primers are free to participate in the amplification reaction. Designed for single copy target detection/ Research Use Only
4. optimiert für...	PCR. qPCR with Sybr® Green. qPCR with TaqMan® Probes. all Thermocyclers
5. Kitkomponenten/Anzahl Ansätze	100 reactions à 50 µl or 200 reactions à 25 µl • 4 x 625 µl RubyTaq PCR Master Mix, 2X
6. Polymerase-Eigenschaften	novel methodology called „primer-sequestration“ • minimizes amplification of non-specific products and primer-dimers • stable at 4°C for extended periods of time with no observed decrease in performance • tested User Friendly™
7. Nachweisspezifität (%)	Hot-start intends no or very few primer-dimer and off-target formation
8. Sensivität (Kopien/Fargetsequenz)	≤ 3 pg. detection of a single copy
9. Quantifizierung	4.35 x 10 ⁻⁵ mutations per base per duplication or 1 mutated base per 23,000 bases synthesized in one round
10. Multiplexing/Farbstoffe	yes
11. Zahl Pipettierschritte	1
12. zertifiziert/lizenziert für	PCR • ISO 9001:2000
13. Besonderheiten	

Kontakt zu Verbänden

Im Jahr 2006 erscheint LABORWELT zweimonatlich, IVW geprüft. Alle Abonnenten des Branchen-Magazins |transkript sowie die Mitglieder der nachfolgenden Gesellschaften erhalten LABORWELT regelmäßig mit freundlicher Empfehlung ihrer Organisationen. Wer sich darüber hinaus für einen Beitritt interessiert, erreicht die Gesellschaften unter folgenden Kontaktdaten:



DECHEMA  Fachsektion Biotechnologie Theodor-Heuss-Allee 25 D-60486 Frankfurt/Main Tel.: +49-(0)-69-7564-289 Fax: +49-(0)-69-7564-272 www.dechema.de	Verband Deutscher Biologen  Corneliusstr. 6 D-80469 München Tel.: +49-(0)-89-26024573 Fax: +49-(0)-89-26024574 info@vdbiol.de www.vdbiol.de	Nationales Genomforschungsnetz  c/o DLR – Koblenzerstr. 112 53177 Bonn-Bad Godesberg Tel.: +49-(0)-228-3821-331 Fax: +49-(0)-228-3821-332 pm-ngfn@dlr.de www.ngfn.de
Deutsche Gesell. für Proteomforschung  c/o MPI für Biochemie Am Klopferspitz 18a D-82152 Martinsried Tel.: +49-(0)-89-8578-3964 Fax: +49-(0)-89-8578-2802 c.kleinhammer@dgpf.org www.dgpf.org	Deutsche Gesellschaft für Genetik  c/o Genetisches Institut der Universität Gießen Heinrich-Buff-Ring 58-62 D-35392 Gießen Tel.: +49-(0)-641-99-35463 Fax: +49-(0)-641-99-35469 www.gfgenetik.de	Deutsche Gesellschaft für Neurogenetik  c/o Institut für Humangenetik Uni Gießen/Schlängenzahl 14 35392 Gießen Tel.: +49-(0)-641-99-41600 Fax: +49-(0)-641-99-41609 www.med.uni-giessen.de /genetik/dgng.html
Österreichische Gesell. für Biotechnologie  c/o Boehringer Ingelheim Austria GmbH Dr. Boehringer-Gasse 5-11 A-1121 Wien Tel.: +43-(0)-1-80105-2311 Fax: +43-(0)-1-80105-9311 www.boku.ac.at/oegbt/	Gesellschaft für Signaltransduktion  c/o Prof. Dr. Ralf Hass Med. Hochschule Hannover AG Biochemie u. Tumoriol. D-30625 Hannover Tel.: +49-(0)-511-532-6070 Fax: +49-(0)-511-532-6071 www.sigtrans.de	Netzwerk Nutrigenomforschung  Arthur-Scheunert-Allee 114 14558 Bergholz-Rehbrücke Tel.: +49-(0)-33200 88 385 Fax: +49-(0)-33200 88 398 verein@nutrigenomik.de www.nutrigenomik.de
DGHM  c/o Gesellschaft für Hygiene & Mikrobiologie Josef-Schneider-Str. 2 97080 Würzburg Tel.: +49-(0)-931-201-46936 Fax: +49-(0)-931-201-46445 www.dghm.de	bts (Biotechnologische Studenteninitiative e.V.)  c/o BIOC COMMUNICATIONS. net GmbH Brunnenstr. 128 13355 Berlin Tel.: +49-(0)-2649-21-21 Fax: +49-(0)-2649-21-11 www.bts-ev.de	Netzwerk RNA-Technologien  c/o Prof. Dr. Volker A. Erdmann Freie Universität Berlin Thielallee 63, D-14195 Berlin Tel.: +49-(0)-30-8385 6002 Fax: +49-(0)-30-8385 6413 erdmann@chemie.fu-berlin.de www.rna-network.com

Akademischer Stellenmarkt

Veröffentlichen Sie Ihre Stellenanzeigen zielgruppengerecht in unserem akademischen Stellenmarkt, der allen nicht-kommerziellen Instituten für Ihre Stellenausschreibungen kostenlos zur Verfügung steht. Bitte senden Sie dazu Ihre Anzeige (1/4 Seite 90 mm breit x 122,5 mm hoch, Logo – jpg oder tiff, 300 dpi Auflösung) an a.macht@biocom.de. Annahmeschluss für die nächste LABORWELT-Ausgabe 1/07 (Erscheinungstermin 16.02.2007) ist der 2. Februar.

Medizinische Hochschule Hannover

Abt. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie



Naturwissenschaftliche(r) Doktorand(in) gesucht

In der Abt. Gastroenterologie der Medizinischen Hochschule Hannover ist zum nächstmöglichen Termin

eine Doktorandenstelle (BATIIa/2)

für ein von der europäischen Kommission gefördertes Projekt zu besetzen (Voraussetzung Dipl. Biochem./Biol. o. a.). In den AG's Kubicka/Kühnel arbeiten wir an onkolytischen, adenoviralen Vektorsystemen zur Therapie solider Tumore. Wir verwenden hierfür selbstentwickelte Adenoviren, die lediglich in Tumorgewebe replizieren und dieses infolge lytischer Zyklen zerstören. Die zentralen Themen sind (1.) Optimierung der tumorspezifischen Vektorreplikation durch transkriptionelle Steuerungssysteme, (2.) De-/Retargeting des therapeutischen Vektors, (3.) gezielte Zerstörung des Vektors in normalen Zellen bzw. Reparatur von Gendefekten mittels Meganukleasen bzw. designer Zinkfinger-Endonukleasen in Zusammenarbeit mit internationalen Partnern (EMBL, Heidelberg, CNIO, Madrid, Collectis S. A., Paris), (4.) die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen zwischen Vektor und Wirtszelle bzw. dem Immunsystem des Wirtsorganismus.

Der Bewerber sollte sich stark für die Zusammenführung grundlegender Erkenntnisse aus div. Bereichen (Virologie, Molekularbiologie, Immunologie) zur Entwicklung neuer Vektorkonzepte interessieren und über ein hohes Maß an Kreativität, Eigeninitiative, Motivation sowie gute Beobachtungsgabe und experimentelles Geschick verfügen. Kenntnisse in allgemeinen molekularbiologischen Techniken sind wünschenswert, aber keine Voraussetzung. Sie werden bei intensiver Betreuung in einem ambitionierten, jungen Team an einer interessanten Schnittstelle zwischen Grundlagenwissenschaft und therapeutischer Zielsetzung auf einem neuen und hoffnungsvollen Gebiet der experimentellen Tumorthherapie mitarbeiten.

Die üblichen Bewerbungsunterlagen bitte an:
 kuehnel.florian@mh-hannover.de oder Dr. Florian Kühnel
 Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
 Medizinische Hochschule Hannover
 Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover
 Tel: 0511 532-3732 bzw. 9401, Fax: 0511 532-2021

An der **Fachhochschule Südwestfalen – Abteilung Iserlohn** – ist im **Fachbereich Informatik und Naturwissenschaften** schnellstmöglich eine

W 2-Professur für Biotechnologie

zu besetzen.

Die Bewerberin / Der Bewerber soll das Lehrgebiet Biotechnologie im bestehenden Bachelor- und geplanten Master-Studiengang Bio- und Nanotechnologien, die im Fachbereich Informatik und Naturwissenschaften an der Abteilung Iserlohn angesiedelt sind, vertreten. Hierzu gehört die Mitwirkung an grundlegenden Lehrveranstaltungen in den Fachgebieten Biologie, Biochemie, Mikrobiologie und Bioverfahrenstechnik.

Es wird erwartet, dass die Bewerberin / der Bewerber besondere Erfahrungen und Kenntnisse im Bereich biologischer Nanotechnologien, Biomaterialien und / oder medizinischer Chemie mitbringt. Sie / Er soll sich beim Aufbau des konsekutiven Master-Studienganges mit den eigenen Spezialgebieten einbringen und sich angemessen in der Lehre an diesem Master-Studiengang beteiligen. Weitere Aufgaben sind die Einwerbung von Drittmitteln und der Ausbau der Forschungsaktivitäten im Fachbereich.

Die Fachhochschule Südwestfalen arbeitet sehr eng mit der regionalen Wirtschaft zusammen. Von den Bewerberinnen und Bewerbern wird erwartet, dass sie sich neben ihren praxisorientierten Lehraufgaben im Rahmen des Technologietransfers und der anwendungsbezogenen Forschung und Entwicklung an dieser Kooperation beteiligen. Weiterhin wird Engagement in den Selbstverwaltungsgremien der Hochschule erwartet.

Einstellungsvoraussetzungen:

- Abgeschlossenes Hochschulstudium • pädagogische Eignung • besondere Befähigung zu wissenschaftlicher Arbeit, die in der Regel durch die Qualität einer Promotion nachgewiesen wird • fünfjährige, den wachsenden Lehraufgaben entsprechende, berufliche Praxis, von der mindestens drei Jahre außerhalb des Hochschulbereichs ausgeübt worden sein müssen.

Die Einstellung erfolgt in der Regel für die Dauer eines Jahres zur Feststellung der pädagogischen Eignung durch Berufung in ein Beamtenverhältnis auf Probe. Danach ist bei Erfüllung der beamtenrechtlichen Voraussetzungen die Berufung in das Beamtenverhältnis auf Lebenszeit vorgesehen; nach Vollendung des 45. Lebensjahres wird ein Angestelltenverhältnis begründet.

Von der Bewerberin / dem Bewerber wird erwartet, dass bei Bedarf Lehrleistungen auch an den anderen Standorten der Hochschule (Hagen, Meschede und Soest) und im Verbundstudium erbracht werden.

Die Fachhochschule Südwestfalen ist bestrebt, den Anteil der Wissenschaftlerinnen in Lehre und Forschung zu erhöhen und ermutigt daher besonders Frauen, sich zu bewerben. Nach Maßgabe des Landesgleichstellungsgesetzes NRW werden Frauen bei gleicher Eignung, Befähigung und fachlicher Leistung bevorzugt berücksichtigt, sofern nicht in der Person eines Mitbewerbers liegende Gründe überwiegen. Bewerbungen geeigneter Schwerbehinderter und Gleichgestellter im Sinne des § 2 Abs. 3 Teil 1 SGB IX sind erwünscht.

Ansprechpartner ist Herr Professor
 Dr. Stadtlander (Tel.: 02371 566-536,
 E-Mail: stadtlander@fn-swf.de).

Aussagekräftige Bewerbungsunterlagen
 sind **auf dem Postweg** bis zum **30.11.2006**
 an den **Rektor der Fachhochschule Südwestfalen, Postfach 20 61, 58590 Iserlohn**,
 zu richten.



Fachhochschule
 Südwestfalen
 Hochschule für
 Technik und Wirtschaft
 University of Applied Sciences



UNIVERSITY ROSTOCK

The University Rostock in Cooperation with the Institute for Low Temperature Plasma Physics (INP Greifswald) is offering a

Full Professor Position (W2) Plasma Engineering

Candidates are expected to develop the area of Plasma Engineering and Automation. Beside the acquisition of research grants conceptual contributions for the strategic development of new application fields are requested. It is planned to combine the position with the director position of the department Plasma Process Technology at the INP.

Candidates have a background in the automation of physical processes and experiences in plasma technology. A Ph.D. degree, strong publication and research record, and postdoctoral experience are required. Women, handicapped persons and minorities are encouraged to apply.

For full consideration, submit your application documents containing vitae, list of publication, research experience and statements of research and teaching interests by November 30th to:

Universität Rostock, Dezernat für Personal und Personalentwicklung, 18051 Rostock, Germany – For additional information contact: Kerstin.Thurow@uni-rostock.de

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH

Postfach 1129, 85758 Neuherberg

Die GSF konzentriert ihre Forschungsarbeiten auf eine der wichtigsten Fragen unserer Gesellschaft, die Gesundheit des Menschen in seiner Umwelt. Ziel ist es, Risiken für die menschliche Gesundheit durch Umweltfaktoren zu erkennen, Mechanismen der Krankheitsentstehung zu entschlüsseln sowie Konzepte zu entwickeln, um die Gesundheit des Menschen und seine natürlichen Lebensgrundlagen auch für die Zukunft zu schützen. Als Forschungseinrichtung des Bundes und des Freistaats Bayern mit Sitz in Neuherberg, im Norden Münchens, sind wir Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft, der größten öffentlichen Forschungsorganisation Deutschlands. Die GSF als Trägerin des Bayerischen Frauenförderpreises 2004 sowie des Total E-Quality-Zertifikates strebt generell eine Erhöhung des Frauenanteils an und fordert deshalb qualifizierte Interessentinnen ausdrücklich auf, sich zu bewerben. Schwerbehinderte werden bei gleicher Eignung bevorzugt.

Das Institut für Humangenetik (IHG) sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt zum Aufbau einer Arbeitsgruppe eine/n

Wissenschaftliche/n Mitarbeiter/in (132/06)

für die Entwicklung und Umsetzung der massenspektrometrischen Analytik, Beratung und Support bei den Proteom-Projekten der GSF sowie zur Mitarbeit beim Betreiben der GSF-Core Facility for Proteomics in Neuherberg (GAC).

Vorausgesetzt wird ein abgeschlossenes Universitätsstudium der Fachrichtung Bioinformatik, langjährige Berufserfahrung in den oben genannten Bereichen sowie vertiefte Kenntnisse und Erfahrung in der MS-Analytik.

Wir bieten eine Vergütung nach TVÖD Das Arbeitsverhältnis ist auf 3 Jahre befristet.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an: Dr. Marius Ueffing
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Humangenetik (IHG), Postfach 1129, 85758 Neuherberg.
Rückfragen richten Sie sich bitte an: Dr. Marius Ueffing ,
Telefon 089/3187-3567, e-mail: ueffing@gsf.de

Das Institut für Entwicklungsgenetik (IEG), AG „Adulte Neurogenese und neurale Stammzellen“ sucht eine/n promovierte/n

Postdoc (120/06)

Unsere AG beschäftigt sich mit der Aufklärung der extrinsischen und intrinsischen Signale, die die Bildung neuer Nervenzellen aus Stammzellen im erwachsenen Gehirn regulieren. Hierzu verwenden wir modernste molekularbiologische, zellbiologische und genetische Methoden *in vitro* und *in vivo* (Infos: <http://www.abayfor.de/forneur-rocell/de/index.php>).

Vorausgesetzt werden ein abgeschlossenes Universitätsstudium der Fachrichtung Biologie (o. verwandtes Fach) mit Promotion, grosses fachliches Interesse, Begeisterungsfähigkeit und Eigenmotivation sowie die Fähigkeit zum eigenverantwortlichen Arbeiten im Team. Erfahrungen in Epigenetik, transkriptioneller Regulation, Molekularbiologie oder Biochemie wären von Vorteil. Wir bieten beste Arbeitsbedingungen, ein dynamisches und innovatives Umfeld, gute Arbeitsatmosphäre und internationale Vernetzung.

Wir bieten eine Vergütung nach TVöD. Das Arbeitsverhältnis ist 30.6.2009 befristet.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an: Dr. Chichung Lie
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Entwicklungsgenetik (IDG), Postfach 1129, 85758 Neuherberg.
Rückfragen: Dr. Chichung Lie, Tel.: 089/3187-2927, e-mail: chichung.lie@gsf

Das Institut für Pathologie (PATH) sucht ab sofort eine/n

Postdoc (122/06)

mit Schwerpunkt Proteinanalyse zur Mitarbeit in einem EU-Forschungsprojekt.

Ein abgeschlossenes Hochschulstudium der Fachrichtung Biologie/ Biochemie o.ä. wird vorausgesetzt. Erfahrung in Proteinanalyse, -isolierung, -aufreinigung, -auf-trennung, Malditof und im Arbeiten mit Zelllinien sind wünschenswert, aber nicht Voraussetzung.

Wir bieten eine Vergütung nach TVöD. Das Arbeitsverhältnis ist bis 28.2.2009 Jahre befristet.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an: Frau Dr. M. Aubele

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Pathologie (PATH), Postfach 1129, 85758 Neuherberg.
Für Rückfragen wenden Sie sich bitte an: PD Dr. M. Aubele,
Telefon 089/3187-4132, e-mail: aubele@gsf.de

Das Institut für Ökologische Chemie (IÖC) sucht zum 01.01.2007 eine/n promovierte/n

Nachwuchswissenschaftler/in (143/06)

für die Synthese neuer organischer Verbindungen zur Entwicklung von Biosensoren; Oberflächenmodifizierungen und Immobilisierungen biologischer Erkennungsmoleküle (Rezeptoren, Proteine, Nucleinsäuren) auf unterschiedlichen Oberflächen (Glas, Kunststoff, Gold etc.); Betreuung von Mitarbeitern und Gästen; Drittmittelerwerb; Kooperation mit Projektpartnern; Dokumentation wissenschaftlicher Ergebnisse (Publikationen/Projektberichte).

Vorausgesetzt werden ein abgeschlossenes Universitätsstudium der Fachrichtung Chemie mit Promotion; fundierte Kenntnisse organischer Synthese und Kopplungs-chemie von Biomolekülen auf unterschiedlichen Oberflächen; gute Kenntnisse in LC, GC, MS, NMR; Erfahrung mit Beantragung, Leitung und Bearbeitung von F+E-Projekten; Teamfähigkeit; sehr gute Beherrschung der englischen Sprache in Wort und Schrift.

Wir bieten eine Vergütung nach TVöD. Das Arbeitsverhältnis ist auf 3 Jahre befristet.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an: Frau Dr. Petra Krämer
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Ökologische Chemie (IÖC), Neuherberg, Postfach 1129, 85758 Neuherberg.
Für Rückfragen wenden Sie sich bitte an: Frau Dr. Petra Krämer
Telefon 089/3187-2772, e-mail: kramer@gsf.de

Das Institut für Strahlenschutz (ISS), AG „Radioökologie“ sucht zum 01.02.2007 eine/n promovierte/n

Biologen/in (Postdoc) (142/06)

für die Planung, Durchführung und Analyse von Experimenten, die sich mit der Akkumulation von Radionukliden wie Radiocäsium und -strontium in Pflanzen- und Hefezellen beschäftigen.

Ziel der AG ist, die Mechanismen bei der Aufnahme, Speicherung und Exkretion von Radiocäsium und Radiostrontium auf molekularer Ebene zu erklären, Schlüsselfaktoren an diesem Prozess zu identifizieren und im Sinne reduzierter Akkumulation zu modifizieren. In unserem Labor wird dazu zunächst mit den Modellsystemen *Arabidopsis thaliana* und Hefe gearbeitet.

Wir erwarten ein abgeschlossenes Universitätsstudium der Fachrichtung Botanik oder Biochemie mit Promotion, Erfahrungen in Pflanzenphysiologie, -molekulargenetik und/oder Hefegenetik und beim Einsatz von Radioisotopen. Die Fähigkeit zur quantitativen Hypothesenbildung, kritischen Datenevaluierung und -diskussion, Bereitschaft zur interdisziplinären Zusammenarbeit, Motivation und Eigeninitiative sind Voraussetzung.

Wir bieten eine Vergütung nach TVöD. Das Arbeitsverhältnis ist auf 3 Jahre befristet.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an: Dr. Katharina Schneider
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Strahlenschutz (ISS), Postfach 1129, 85758 Neuherberg.
Rückfragen richten Sie bitte an: Dr. Heiko Lickert,
Telefon 089/3187- 2203, e-mail: katharina.schneider@gsf.de

The Interdisciplinary Centre for Clinical Research (IZKF) at the Faculty of Medicine of the University of Leipzig invites applications for the position of

2 PhD students (biology, biochemistry)

in a joint project between the Research Groups "Mechanisms of Cell Migration" (Dr. W. H. Ziegler) and "Neural Plasticity" (Dr. J. Hirrlinger) to be funded for a period of 2 years up to BAT-0 IIa/2 level from 1st January 2007 plus an optional 3rd year pending approval.

The IZKF conducts research into cell-cell- and cell-matrix-interactions relevant to diagnostic and therapeutic applications, focussing on the specialist areas of immunology, endocrinology, neurosciences and oncology. In the context of the neuroscience field, the project investigates the influence of the regulation of cell-cell-contacts by an intracellular adaptor protein on the function of astrocytes in the central nervous system. We have established an inducible mouse model which allows us to express a mutated form of this protein selectively in astrocytes. Using this mouse model we will investigate the impact of disturbed signalling at cell-cell-contacts on the regulation of astrocytic structure, motility and function as well as neuronal signalling processes in physiological and pathophysiological situations using modern imaging technology (2-photon-imaging), biochemical and molecular biology (e.g. DNA-arrays) tools.

We are looking for highly motivated young scientists with a strong interest in neuroscience especially in the biology of glial cells. Since the project combines aspects of neuroscience and cell biology involving a number of collaborations, the candidates should also be highly interested in interdisciplinary research. A background on neuroscience or cytoskeleton research as well as imaging techniques, immunohistochemistry or mouse genetics would be appreciated, but is not mandatory. We are a young and dedicated team able to provide a thorough training of the techniques required. Our laboratory is located at the core building of the IZKF with excellent infrastructure. Close contact and collaborations exists with the Paul-Flechsig-Institute for Brain Research and other groups within the University of Leipzig and outside.

For further information and application (application by email welcome) please contact Dr. Wolfgang Ziegler

(Tel.: ++49-(0)341-97 15945, e-mail: wolfgang.ziegler@medizin.uni-leipzig.de, IZKF Leipzig, Inselstraße 22, 04103 Leipzig, Germany)



Ludwig-Maximilians-Universität München

Max-Planck-Institute for Neurobiology, Dept. Neuroimmunology and Institute for Clinical Neuroimmunology, LMU Munich

PhD student position

We are investigating the antigen recognition of autoaggressive T- and B- cells in autoimmune diseases such as multiple sclerosis or inflammatory myopathies. To this end, we isolate single cells from human biopsy samples by laser microdissection, identify paired T cell receptor alpha- and beta chains by multiplex PCR, and "revive" the autoreactive T cell receptors in a T-hybridoma cell line (S. Seitz et al. (2006) PNAS 103:12057-62). To investigate the antigens of the T cell receptors, we screen combinatorial peptide libraries and cDNA expression libraries which are generated from patients tissue. After their identification, the antigens may be characterized in vitro and in animal models. This strategy might lead to new concepts in diagnosis and therapy.

We are looking for a highly motivated person (biochemist, biologist) who is interested in a project that reaches "from bench to bedside". The project is integrated into a broad concept to investigate the pathogenesis of multiple sclerosis and contains a broad methodological spectrum (pathology, immunology, molecular biology, protein chemistry).

The position is financed by a grant (TVöD) from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereich 571 (Autoimmune diseases). It is limited to two years with an option for extension.

Inquiries: Dr. Klaus Dornmair, MPI f. Neurobiology, Dept. Neuroimmunology, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried / Munich, Germany.
Tel.: ++49-89-8578-3566, e-mail: dornmair@neuro.mpg.de.
http://www.neuro.mpg.de/english/rd/ni/research/Autoaggressive_T-cell_receptor_molecules_/index.html

LMU München, Department Biologie I

Promotionsstudent/in

Wir suchen mehrere Doktorand/innen im Rahmen des neu bewilligten Exzellenzclusters an der LMU (Munich Centre for Integrated Protein Science). Bearbeitet werden soll die Thematik des Proteintransports und der Proteinsortierung in pflanzlichen Organellen. Es findet eine Vielzahl moderner molekularbiologischer und biochemischer Methoden Anwendung. Vorausgesetzt wird Spaß an der Laborarbeit und Interesse für den genannten Themenkreis. Grundlegende Kenntnisse in Molekular- und Zellbiologie sind erwünscht.

Bewerbungen bitte ausschließlich in schriftlicher Form an: Prof. Dr. J. Soll
LMU München, Department Biologie I, Menzingerstr. 67, D-80638 München

Promotionsarbeit (Dr. rer. nat.)

Wir suchen zum 1.1.07 oder später eine/n Doktorandin/Doktoranden für ein im Rahmen des SFB-TR1 geförderten Projektes.

Wir untersuchen unter Verwendung modernster Methoden der Biochemie, Molekularbiologie und Mikroskopie (LSM) die Calcium-Regulation in pflanzlichen Organellen sowie verschiedene Aspekte der Thylakoidbiogenese.

Ihre Bewerbung richten sie bitte per Post an: PD Dr. Ute Vothknecht
LMU München, Department Biologie I, Menzinger Str. 67, D-80638 München oder als E-mail an vothknecht@lrz.uni-muenchen.de

An der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Fachbereich Biowissenschaften, Institut für Molekulare Biowissenschaften (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Eckhard Boles), ist zum 01.01.2007 (oder später) die Stelle einer/eines

Wissenschaftlichen Mitarbeiters/Mitarbeiterin

(Doktoranden-Stelle, BAT IIa/2)

für das Forschungsgebiet Membrantransport, befristet für zunächst 3 Jahre, zu besetzen. Für die Befristung des Vertrages sind die Regelungen des Hochschulrahmengesetzes maßgeblich.

Einstellungsvoraussetzungen: Abgeschlossenes Diplom in Biochemie oder Biologie/Molekulare Biologie oder gleichwertiger Abschluß. Erfahrungen mit proteinchemischen und/oder zellbiologischen Methoden werden vorausgesetzt, molekularbiologische Methoden sind von Vorteil. Es wird eine hohe Motivation der Bewerberin/des Bewerbers erwartet.

Aufgabengebiet: Die Tätigkeit umfasst die Mitarbeit im SFB628 „Functional Membrane Proteomics“, Teilprojekt Boles „Role of Packaging Chaperones in Membrane Protein Folding and Cargo Selection of ER-derived COPII-coated Secretory Transport Vesicles“. Es soll die Faltung und Reifung von Membranproteinen im ER der Hefe unter Beteiligung von Hilfsproteinen untersucht werden. Die Stelle wird vorbehaltlich der endgültigen Bewilligung durch die DFG ausgeschrieben. Die Durchführung einer Promotionsarbeit während der Laufzeit der Stelle wird erwartet. Neben der Forschungsarbeit werden die Beteiligung in der Lehre und die Mitwirkung bei Aufgaben der Verwaltung und Organisation erwartet.

Weitere Informationen über die Arbeitsgruppe sind über die folgende Homepage-Adresse möglich: <http://cgi.server.uni-frankfurt.de/fb15/boles>.

Bewerbungen mit den üblichen Unterlagen senden Sie bitte bis zum 24.11.06 an:
Prof. Dr. Eckhard Boles, Institut für Molekulare Biowissenschaften,
Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt am Main,
oder per Email: e.boles@bio.uni-frankfurt.de.

Paul-Ehrlich-Institut Paul-Ehrlich-Straße 51 - 59,
63225 Langen, Telefon (06103) 77-11 00

Das Paul-Ehrlich-Institut ist eine wissenschaftliche Einrichtung des Bundes, die für die Zulassung und Chargenprüfung immunbiologischer Arzneimittel zuständig ist und auf den damit verbundenen Gebieten der Lebenswissenschaften (z.B. Virologie, Bakteriologie, Allergologie, Immunologie, Hämatologie, Medizinische Biotechnologie) Forschung betreibt.

In der Abteilung Virologie sind zum nächstmöglichen Zeitpunkt im Rahmen von Forschungsvorhaben mehrere Positionen als

Wissenschaftliche Angestellte

(Postdoc)

Stellenbewertung: E 13 / 14 TVöD

sowie

Doktoranden / Doktorandinnen

Stellenbewertung: E 13/2 TVöD zu besetzen.

Aufgabenprofil:

In einem stimulierenden interdisziplinären Arbeitsklima und exzellent ausgestatteten Laboratorien

- Mitwirkung in Forschungsprojekten zur molekular-virologischen Untersuchung von Influenza-A-Viren (auch hoch pathogener aviärer Influenzaviren) und zur Entwicklung von neuen Influenzavirus-spezifischen Impfstoffen
- Mitwirkung in internationalen Forschungsprojekten zur Entwicklung und Charakterisierung von neuartigen Vacciniavirus- (Vektor-) Impfstoffen gegen Infektions- und Tumorerkrankungen.

Anforderungsprofil – Wissenschaftliche Angestellte/r:

- Abgeschlossenes Studium der Biologie/Humanbiologie oder Biochemie bzw. Veterinär- oder Humanmedizin
- Promotion
- Eingehende praktische Erfahrung im Umgang mit Influenzaviren bzw. mit Orthopockenviren oder anderen DNA-Viren
- Fundierte praktische Erfahrung in allen gängigen gentechnologischen bzw. biochemischen Methoden der modernen molekularbiologischen Charakterisierung und der zielgerichteten Herstellung genetischer Konstrukte (Klonierungsverfahren)
- Im Rahmen der Influenzaforschung Bereitschaft zur Einarbeitung in die Regularien zur Zulassung von saisonalen und pandemischen Impfstoffen
- Kommunikations- und Teamfähigkeit

Anforderungsprofil – Doktorand/in:

- Abgeschlossenes Studium der Biologie/Humanbiologie oder Biochemie bzw. Veterinär- oder Humanmedizin
- Eingehende Kenntnisse in Mikrobiologie, Virologie und/oder Immunologie
- Erfahrungen in molekularbiologischen, immunologischen und/oder virologischen Techniken
- Kommunikations- und Teamfähigkeit

Die Beschäftigungsverhältnisse sind vorerst auf zwei bis fünf Jahre befristet. Die wöchentliche Arbeitszeit beträgt 39 Stunden; Teilzeitbeschäftigung ist grundsätzlich möglich.

Die Eingruppierung erfolgt nach den tariflichen Bestimmungen des TVöD. Auswärtigen Bewerbern ist das Paul-Ehrlich-Institut bei der Wohnraumbeschaffung behilflich. Trennungsgeld und Umzugskosten werden nach den gesetzlichen Vorschriften gewährt.

Schwerbehinderte werden bei gleicher Eignung bevorzugt berücksichtigt.

Das Paul-Ehrlich-Institut fördert die Gleichstellung von Frauen und Männern und ist daher an Bewerbungen von Frauen interessiert.

Bitte richten Sie Ihre vollständigen Bewerbungsunterlagen bis zum 24. November 2006 an das Personalreferat des Paul-Ehrlich-Instituts.



Ausschreibung einer unbefristeten Stelle eines/r Universitätsprofessors/in für Bio-Organische Chemie gemäß § 94 Abs. 2 Z 1 UG 2002 an der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johannes Kepler Universität Linz, Bewerbungsfrist 11.12.2006

An der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johannes Kepler Universität Linz ist eine

Professur für Bio-Organische Chemie

in Form eines unbefristeten Angestelltenverhältnisses voraussichtlich ab 1. Oktober 2007 zu besetzen.

Aufgabe des/der Stelleninhabers/in wird es sein, das Fachgebiet in Lehre und Forschung zu vertreten und weiter zu entwickeln. Die detaillierten Anforderungen sind in einem Stellenprofil dokumentiert, das im Internet unter der Adresse <http://www.jku.at/professuren> abrufbar ist.

Bewerbungsvoraussetzung ist eine Habilitation oder habilitationsäquivalente Qualifikation im ausgeschriebenen Fach.

Die Johannes Kepler Universität strebt eine Erhöhung des Anteils an Frauen im wissenschaftlichen Personal an und fordert deshalb qualifizierte Frauen nachdrücklich auf, sich zu bewerben. Bei gleicher Qualifikation wird bevorzugt eine Frau berufen.

Interessent/inn/en werden gebeten, ihre Bewerbung unter Beachtung der im Stellenprofil angegebenen Kriterien samt den dort verlangten Anlagen sowie das Formblatt in elektronischer Form bis zum 11. Dezember 2006, 24:00 Uhr an den Rektor der Johannes Kepler Universität Linz (bewerbung@jku.at) zu senden. Falls die Übersendung von Anlagen in elektronischer Form nicht möglich ist, sind diese in fünffacher Ausfertigung derart zu übersenden, dass sie längstens innerhalb einer Nachfrist von einer Woche nach Ende der Bewerbungsfrist beim Rektor einlangen.

Johannes Kepler Universität (JKU) Linz, Altenberger Str. 69, A-4040 Linz, Telefon +43-732/2468, Fax +43-732/2468-8822

An der Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik, Institut für Verfahrenstechnik ist am Lehrstuhl Bioprozesstechnik von Herrn Prof. Dr.-Ing. Reichl zum 01.02.2007 die Stelle einer/eines

Laborantin/Laborant

zu besetzen. Die Vergütung erfolgt nach TVöL EGr. 6

Aufgaben:

- Vorbereitung und Durchführung der Aufarbeitung von biologischen Produkten
- Durchführung analytischer Methoden
- Auswertung und datentechnische Aufbereitung der Messungen zur Charakterisierung von Produktaufarbeitungen

Anforderungen:

- Erfolgreich abgeschlossene Berufsausbildung als Laborant/in
- Berufserfahrung
- Kenntnisse in Analytik und Produktaufarbeitung
- Sehr gute Englischkenntnisse
- Teamfähigkeit sowie selbstständige und zuverlässige Arbeitsweise

Frauen werden ausdrücklich zur Bewerbung aufgefordert. Schwerbehinderte werden bei gleicher Eignung bevorzugt berücksichtigt.

Es wird gebeten, das Einverständnis zu erklären, daß die Gleichstellungsbeauftragte/Vertretung Einsicht in die Bewerbungsunterlagen/Personalakte nehmen bzw. an den Bewerbungsgesprächen teilnehmen kann.

Bewerbungen mit den üblichen Unterlagen sind bis zum 01. Dezember. 2006 (Bewerbungsschluss) elektronisch zu richten an:

email: mwolff@mpi-magdeburg.mpg.de
Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme
Dr. Michael Wolff, Sandtorstrasse 1, 39106 Magdeburg



+49 (69) 90 43 30

Erst informieren! Auch Samstag/Sonntag von 17.00-19.00 Uhr

Expertise in Proteinanalyse oder Pathologie?

Technical Sales Specialist (m/w) Kunden- und fachliche Teamverantwortung Global Player der Biotechnologie

Haben Sie ein naturwissenschaftliches Studium, idealerweise der Biologie / Molekularbiologie / Biochemie, Medizin oder einem verwandten Bereich mit Erfolg abgeschlossen? Verfügen Sie über ausgewiesene Expertise auf dem Gebiet der Proteinanalyse oder der klinischen Pathologie / Immunologie? Sind Sie bereits einige Jahre im Vertrieb komplexer Produkte und Dienstleistungen in einem dieser Fachgebiete erfolgreich? Und suchen Sie nun eine neue Herausforderung, in der Sie Ihr Expertenwissen und Ihre vertriebsorientierte Persönlichkeit voll einbringen können? Dann lesen Sie bitte: Wir sind ein börsennotiertes, weltweit erfolgreiches Biotechnologieunternehmen und betreuen mit mehreren tausend engagierten Mitarbeitern höchst anspruchsvolle

Kunden. Wir sind bereits weltweit in führenden Laboren, Forschungseinrichtungen und Life-Science-Konzernen etabliert und werden zukünftig noch erfolgreicher sein. Im Rahmen unserer weiteren Expansion suchen wir Persönlichkeiten mit Ihrer Qualifikation als Technical Sales Specialist für die Bereiche Proteinanalyse oder Pathologie/ Immunologie. In dieser vielseitigen Aufgabe kombinieren Sie Ihre eigene Kundenverantwortung erfolgreich mit einer Technologieverantwortung und unterstützen auch internationale Vertriebsteams. Mehr zum Unternehmen, dieser Herausforderung und den langfristigen Perspektiven die wir Ihnen in unserer internationalen Organisation bieten können, sagt Ihnen gerne unser Berater: Rufen Sie Herrn Tietze an, Kennziffer LW 6586.

Baumann Unternehmensberatung

Frankfurt ♦ London ♦ Paris ♦ New York ♦ Buenos Aires

Hanauer Landstr. 220 • D-60314 Frankfurt am Main • www.baumann-ag.com

Telefon +49 (69) 90 43 30 • Telefax +49 (69) 90 43 31 70

Leibniz
Universität Hannover



An der Leibniz Universität Hannover, Abteilung Molekulare Ertragsphysiologie, Institut für Zierpflanzenbau & Gehölzwissenschaften sind ab dem 1.11./1.12.2006 zwei Stellen

einer(s) wissenschaftlichen Mitarbeiterin(s)

zu besetzen (1/2 BAT IIa).

In einem BMBF-Projekt zur Erforschung der Wirkung der Schwerkraft auf Pflanzenzellen wird die Funktion eines Phospholipase-A-Gens in *Arabidopsis* untersucht. Mitwirkung an Weltraum-Experimenten (TEXUS-Raketenversuch in Kiruna, Versuch in der ISS und Shuttle) ist notwendig.

In dem zweiten Projekt wird die Funktion von NO im Wirkungsmechanismus von Cytokinin und Polyaminen in *Arabidopsis* untersucht. Das Schwergewicht liegt auf der Suche nach dem Enzym, das in der Pflanze NO aus einem organischen Substrat herstellt (pflanzliche „NOS“).

Erfahrung in alle einschlägigen molekularen Techniken (PCR-Analysen, RT-PCR-Analyse, Microarrays, Protein-Expression und -Reinigung in Expressionssystemen) mit *Arabidopsis* oder höheren Pflanzen ist erwünscht, aber nicht Voraussetzung.

Forschungsgebiet der Abteilung ist die Signaltransduktion der Hormone Auxin (einschließlich Gravitropismus) und Cytokinin mit dem Schwerpunkt der Genfamilien für Phospholipasen A und Phospholipasen C und den Genfamilien des Stickoxid-Metabolismus (NO) in *Arabidopsis*.

Frauen sind ausdrücklich aufgefordert sich zu bewerben. Schwerbehinderte werden bei gleicher Qualifikation bevorzugt berücksichtigt.

Bewerbungen mit Lebenslauf, Abiturzeugnis und weiteren Zeugnissen und Literaturliste an: Prof. Dr. G. Scherer, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover, Email: scherer@zier.uni-hannover.de, Web: <http://www.gartenbau.ertragsphysiol.uni-hannover.de/>



Dipl. Biologen/innen, Dipl. Chemiker/innen, Dipl. Physiker/innen

Wir sind eine junge, dynamische Forschergruppe in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie am Universitätsklinikum Aachen. Im Rahmen von DFG-geförderten Projekten und weiteren Drittmittelförderungen suchen wir Promotionsstudenten/innen.

Grundvoraussetzung sind Leistungsbereitschaft, Teamgeist und Spaß am wissenschaftlichen Arbeiten.

Die Vergütung erfolgt nach BAT IIa/2 oder als Forschungsstipendium für besonders qualifizierte Kandidaten im Rahmen des Graduiertenkollegs 1089.

Unsere Forschungsprojekte umfassen biochemische, proteinbiochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen des L-Arginin-NO-Stoffwechsels unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

Bildung, Transport und Speicherung von Stickstoffmonoxid im Blut und im Gewebe und dessen Einfluss auf Blutfluss und Herzfunktion stellen die Zielgrößen der Projekte dar.

Das Methodenspektrum, welches Sie in allen Teilgebieten und in den verschiedenen Projekten erlernen/erarbeiten können ist vielfältig. Standardverfahren der Molekularbiologie und Proteinbiochemie werden abgedeckt, jedoch arbeiten wir ebenfalls mit hochspezialisierte Verfahren der Proteinbiochemie und Biochemie.

In Bioassays wird üblicherweise die physiologische Relevanz des Stoffwechselweges untersucht und mit in unserem Labor entwickelten hochsensitiven biochemisch-analytischen Verfahren kombiniert.

Des Weiteren suchen wir eine motivierte, flexible, leistungsfähige und teamfähige Verstärkung

MTAL

(Drittmittelprojekt, befristet)

Grundlagenforschung

(hochsensitive biochemische Analyseverfahren zur Detektion von Stickstoffmonoxid und seiner Metabolite, Immunhistochemie, Proteinbiochemie und Molekularbiologie wie spez. Zellkulturverfahren, *in vitro*-Assays und *in vivo*-Untersuchungen zur Erfassung der Herz-Kreislauffunktion am Tiermodell)

Klinischen Studien

(Quantifizierung der Gefäßfunktion mittels hochauflösender Sonographie und weiteren angiologischen Messmethoden)

Anforderungen

PC-Kenntnisse (Office)

Methoden: Grundlagen in klinischer Chemie, sterilem Arbeiten und Immunhistochemie.

Kenntnisse in den von uns spezifisch angewendeten Methoden nicht erforderlich.

Ansprechpartner: Dr. med. T. Rassaf

Universitätsklinikum Aachen Medizinische Klinik / Klinik für Kardiologie,
Pneumologie und Angiologie
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
e-mail: molekularekardiologie@ukaachen.de

Im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg sind zwei naturwissenschaftliche

Promotionsstellen

zu vergeben. Die Stellen sind zunächst für die Dauer von 2 Jahren befristet, die Vergütung erfolgt nach Vergütungsgruppe BATIIa/2. Die Einstellung erfolgt zum 01.01.2007.

Die Arbeiten sollen zur Aufklärung der Mechanismen der Strahlenempfindlichkeit und – Resistenz bei Tumor – und Normalzellen beitragen.

Angewandt wird ein breites Methodenspektrum, das von klassischen biochemischen Techniken (Zellkultur, Protein-Gelelektrophorese, Western Blot) bis zu modernen zellbiologischen (Digitale Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie) und molekularbiologischen Methoden reicht.

Unsere ausgewählten Publikationen zur Information:

- Djuzenova C., Mühl B., Schakowski R., Oppitz U., Flentje M. (2004). Normal expression of DNA repair proteins, hMre11, Rad50 and Rad51 but protracted formation of Rad50 containing foci in X-irradiated skin fibroblasts from radiosensitive cancer patients. *Brit. J. Cancer* 90:2356-2363.
- Mahrhofer H., Bürger S., Oppitz U., Flentje M., Djuzenova C.S. (2006). Radiation-induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 62:573-580.
- Djuzenova C.S., Mühl B., Fehn M., Oppitz U., Müller B., Flentje M. (2006). Radiosensitivity in breast cancer assessed by the Comet and micronucleus assays. *Brit. J. Cancer* 94:1194-1203.

Der/die Bewerber/in sollte ein Biologie-/Biochemiestudium abgeschlossen haben und über gute Laborkenntnisse und -techniken verfügen. Kenntnisse im Umgang mit Zellkulturen sind erforderlich, Erfahrungen mit immunhistochemischen und Flowzytometrie-Techniken sind wünschenswert aber keine Voraussetzung. Wir suchen Bewerber mit einem hohen Maß an Einsatzbereitschaft, Spaß an der wissenschaftlichen Arbeit, Motivation und Teamgeist. Schwerbehinderte Bewerber werden bei ansonsten im Wesentlichen gleicher Eignung bevorzugt eingestellt.

Bewerbungskosten werden nicht übernommen.

Weitere Informationen und Auskunft erteilt Ihnen per E-Mail Frau Dr. Djuzenova (djuzenova_t@klinik.uni-wuerzburg.de).

Ihre vollständigen Bewerbungsunterlagen schicken Sie bitte an: Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg Prof. Dr. M. Flentje, Josef-Schneider-Straße 11, 97080 Würzburg

The International PhD Program of DKFZ announces

12 PhD positions

The positions are available in the seven research programs of DKFZ:

1. Cell Biology and Tumor Biology
2. Structural and Functional Genomics
3. Cancer Risk Factors and Prevention
4. Tumor Immunology
5. Innovative Cancer Diagnostics and Therapy
6. Infection and Cancer
7. Translational Oncology

Further information and application forms are available at <http://www.dkfz.de/phd/>.

Candidates should hold a Diploma/Master degree.

We are looking for excellent and ambitious candidates with the ability to work in a team, good communication skills in English as well as flexibility and high motivation.

The salary is for three years according to the general guidelines in academia (BAT).

Candidates should send their application by January 15th 2007 latest to: German Cancer Research Center (DKFZ) / PhD Program Office (M070) Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Email: phd-prog@dkfz.de



+49 (69) 90 43 30

Erst informieren! Auch Samstag/Sonntag von 17.00-19.00 Uhr

Erfolgreich in Berlin

Account Manager/in Global Player der Biotechnologie

Haben Sie ein naturwissenschaftliches Studium, idealerweise der Biologie / Molekularbiologie / Biochemie oder einem verwandten Bereich mit Erfolg abgeschlossen? Verfügen Sie bereits über mehrere Jahre Vertriebs Erfahrung in der Biotechnologie oder reizt Sie der Einstieg in die Übernahme von vertrieblicher Verantwortung in einem erstklassigen und leistungsorientierten Umfeld? Interessiert Sie ein breites Spektrum biotechnologischer Produkte und Dienstleistungen? Können Sie mit Entscheidungsträgern in Wissenschaft und Industrie zielgerichtet und erfolgreich agieren? Suchen Sie nun nach einer Herausforderung in der Sie erfolgreich Ihre Vertriebslaufbahn in einem TOP-Unternehmen starten oder fortführen können? Dann lesen Sie bitte: Wir sind ein börsennotiertes, weltweit erfolgreiches Biotechnologie-

unternehmen und betreuen mit mehreren tausend engagierten Mitarbeitern höchst anspruchsvolle Kunden. Wir sind bereits weltweit in führenden Laboren, Forschungseinrichtungen und Life-Science-Konzernen etabliert und werden zukünftig noch erfolgreicher sein. Im Rahmen unserer weiteren Expansion suchen wir deshalb eine Persönlichkeit mit Ihrer Qualifikation als Account Manager für die Region Berlin. In dieser Aufgabe ist die Gewinnung neuer Kunden ebenso bedeutend wie der Ausbau bestehender Kundenbeziehungen. Dabei werden Sie von einem interdisziplinären und spezialisierten Team tatkräftig unterstützt. Mehr zum Unternehmen, dieser Herausforderung und den langfristigen Perspektiven, die wir Ihnen bieten, sagt Ihnen gerne unser Berater: Rufen Sie Herrn Tietze an, Kennziffer LW 6585.

Baumann Unternehmensberatung

Frankfurt ♦ London ♦ Paris ♦ New York ♦ Buenos Aires

Hanauer Landstr. 220 • D-60314 Frankfurt am Main • www.baumann-ag.com

Telefon +49 (69) 90 43 30 • Telefax +49 (69) 90 43 31 70

Das **Universitätsklinikum Erlangen** bietet mit mehreren Sonderforschungsbereichen, Graduiertenkollegs und einem Interdisziplinären Klinischen Forschungszentrum (IZKF) ein exzellentes wissenschaftliches Umfeld.

Die Abteilung Molekulare und Experimentelle Chirurgie sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt

Naturwissenschaftliche Doktoranden/innen

mit Diplom in Biologie, Biochemie, Chemie oder Molekularer Medizin zur Mitarbeit an einem durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt. Im Rahmen des Projekts soll über die Isolierung von Bindungsproteinen der Wirkmechanismus eines an der Regulation von Angiogenese beteiligten Moleküls aufgeklärt werden.

Unsere aus Naturwissenschaftlern und technischem Personal bestehende Forschungsgruppe ist in neuen und sehr gut ausgestatteten Laborräumen mit modernster apparativer Ausstattung untergebracht und arbeitet interdisziplinär mit den wissenschaftlich tätigen Ärzten der Chirurgischen Klinik und Forschungsgruppen der Industrie zusammen. Mehr Information zum Forschungsprofil der Abteilung finden Sie in aktuellen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe:

Naschberger et al., Am. J. Pathology 169, 1088-99 (2006), Grimm et al., Blood, 105, 3263-9 (2005), Naschberger et al., Biochem. J. 379, 409-20 (2004), Guenzi et al., EMBO J., 22, 3772-82 (2003)

Die Stellen sind auf 3 Jahre befristet und werden nach TVL 13/2 (vormals BAT Ila/2) vergütet. Fragen beantwortet Ihnen gerne

Prof. Dr. rer. nat. Michael Stürzl, Tel.: 09131 85-331 09, e-mail: Michael.Stuerzl@chir.imed.uni-erlangen.de

Schriftliche Bewerbungen mit Lebenslauf, Zeugnissen und einer Kurzbeschreibung Ihrer bisherigen Forschungstätigkeit senden Sie bitte an: Prof. Dr. rer. nat. Michael Stürzl, Chirurgische Klinik mit Poliklinik, Abt. für Molekulare und Experimentelle Chirurgie, Schwabachanlage 10, 91054 Erlangen

LABORWELT

INFOSERVICE



INFOSERVICE

Fax +49 (0)30 26 49 21-11

Wünschen Sie weitere Informationen von unseren Inserenten?

Ganz einfach: Kreuzen Sie die gewünschten Kennziffern an, Absender drauf und ab ins Fax! Ihre gewünschten Infos kommen umgehend.

- | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <input type="radio"/> 11LW 06 | <input type="radio"/> 23LW 06 | <input type="radio"/> 35LW 06 | <input type="radio"/> 47LW 06 |
| <input type="radio"/> 12LW 06 | <input type="radio"/> 24LW 06 | <input type="radio"/> 36LW 06 | <input type="radio"/> 48LW 06 |
| <input type="radio"/> 13LW 06 | <input type="radio"/> 25LW 06 | <input type="radio"/> 37LW 06 | <input type="radio"/> 49LW 06 |
| <input type="radio"/> 14LW 06 | <input type="radio"/> 26LW 06 | <input type="radio"/> 38LW 06 | <input type="radio"/> 50LW 06 |
| <input type="radio"/> 15LW 06 | <input type="radio"/> 27LW 06 | <input type="radio"/> 39LW 06 | <input type="radio"/> 51LW 06 |
| <input type="radio"/> 16LW 06 | <input type="radio"/> 28LW 06 | <input type="radio"/> 40LW 06 | <input type="radio"/> 52LW 06 |
| <input type="radio"/> 17LW 06 | <input type="radio"/> 29LW 06 | <input type="radio"/> 41LW 06 | <input type="radio"/> 53LW 06 |
| <input type="radio"/> 18LW 06 | <input type="radio"/> 30LW 06 | <input type="radio"/> 42LW 06 | <input type="radio"/> 54LW 06 |
| <input type="radio"/> 19LW 06 | <input type="radio"/> 31LW 06 | <input type="radio"/> 43LW 06 | <input type="radio"/> 55LW 06 |
| <input type="radio"/> 20LW 06 | <input type="radio"/> 32LW 06 | <input type="radio"/> 44LW 06 | <input type="radio"/> 56LW 06 |
| <input type="radio"/> 21LW 06 | <input type="radio"/> 33LW 06 | <input type="radio"/> 45LW 06 | <input type="radio"/> 57LW 06 |
| <input type="radio"/> 22LW 06 | <input type="radio"/> 34LW 06 | <input type="radio"/> 46LW 06 | <input type="radio"/> Beilage |

Name:

Institution:

Anschrift:

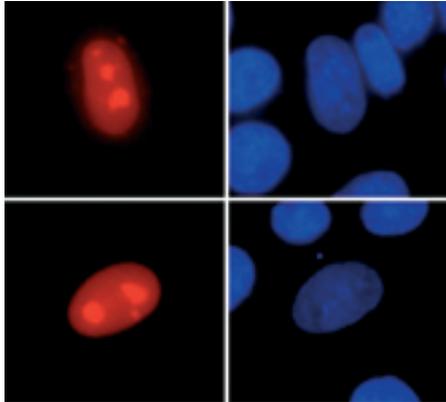
Tel./Fax:

Auch im Internet unter www.biocom.de

Kennziffer **26 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de

Nachweis der Spezifität von RNAi-vermittelten Phänotypen

Mit dem „Quick and Easy RNAi Rescue Kit“ von Gene Bridges kann die Spezifität von RNAi-Knock-downs überprüft werden. Parallel zum eigentlichen RNAi-Ansatz wird



ein homologes, RNAi-resistentes Targetgen-Konstrukt transfiziert, das den Knockdown-Phänotyp der ursprünglichen RNAi aufhebt, wenn dieser spezifisch ist. Hierbei werden sogenannte BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) verwendet, auf denen sich das resistente Zielgen unter Kontrolle eigener Promotoren und regulatorischer Sequenzen befindet. Das Zielgen wird so ausschließlich endogen exprimiert, und artifizielle Effekte durch Überexpression können ausgeschlossen werden. Die Identifizierung BAC-transfizierter Zellen erfolgt durch die Expression des SNAP-Tags, das mit dem Benzylpyrimidin-Derivat TMRStar markiert ist. Dieses wird mit Hilfe der Red/ET-Rekombinationstechnologie in den BAC-Backbone kloniert.

Erfolgreich mit BAC transfizierte Zellen werden so verlässlich und einfach detektiert.

Kennziffer **27 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de

Neue LANCE® Ultra TR-FRET Assay-Plattform

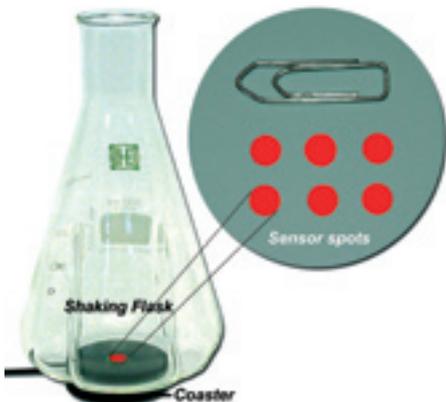
Mit PerkinElmers LANCE® TR-FRET (zeit-aufgelöster Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Technologie lassen sich Assays für Kinasen, Kern-Rezeptoren oder auch Protein-Protein-Interaktionen etablieren. Neben dem bisher im klassischen LANCE-Format als Akzeptor verwendeten APC bietet PerkinElmer jetzt in der LANCE® Ultra-Plattform das neue ULight™ Akzeptor-Molekül an. LANCE® Ultra nutzt dabei die Eigenschaften eines Euro-

prium-Chelats als Donor und anschließendem FRET auf das niedermolekulare ULight™ mit Emission im roten Wellenlängen-Bereich. Der Europium-Donor erlaubt eine zeitverzögerte Signal-Detektion und der ULight™-Akzeptor liefert hohe Quantenausbeuten im langwelligen Bereich. Beides resultiert in einem hochempfindlichen TR-FRET-Assay. Meßbar ist die neue LANCE® Ultra-Plattform auf den meisten Standard TR-FRET-Detektions-Instrumenten.

Kennziffer **28 LW 06** · Informationen ordern? · www.biocom.de

Beschichtung mit optochemischen O₂- und pH-Sensoren

Auf Disposables oder autoklavierbaren Gefäßen können opto-chemische Sensoren für die online-Sauerstoff- und -pH-Bestimmung



angebracht werden; Sauerstoffsensoren sind autoklavierbar und pH-Sensoren sterilisierbar. Diesen Service bietet PreSens speziell OEM-Herstellern und Produktentwicklern an. Jede Glas- und transparente Kunststofffläche kann mit den Sensoren versehen werden. Somit ist berührungsloses Messen in Schüttelkolben, Petrischalen, Objektträgern, Küvetten etc. von außen durch die Wand möglich, ohne den Behälter zu zerstören. Die Sauerstoffkonzentrationen und pH-Werte können unter sterilen Bedingungen kontinuierlich gemessen werden.

Neben dem Service der Beschichtung besteht die Möglichkeit für OEM-Hersteller und Entwickler, die Technologien der PreSens GmbH auch in eigene Produkte zu integrieren.

Kennziffer **29 LW 06** · www.biocom.de

Neues NanoPhotometer™

Das neue NanoPhotometer von Implen ermöglicht spektrophotometrische Analysen von Proben im Submikroliter-Bereich (0,7 bis 5 µl) mit Hilfe der LabelGuard™-Mikroliter-Meßzelle. Die automatische Verdünnung der Proben um den Faktor 10 oder 50 gewährleistet eine exzellente Reproduzierbarkeit.



Darüber hinaus sind auch Messungen mit Standard- und Ultramikroküvetten möglich. Der Konzentrationsbereich für dsDNA liegt bei 15 bis 4.250 ng/µl. Der Wellenlängenbereich für einen kompletten Scan reicht von 200 nm bis 950 nm, der für Einzel- oder Mehrfachwellenlängenmessungen von 190 nm bis 1100 nm.

Kennziffer **30 LW 06** · www.biocom.de

Neuerungen bei Evaporatoren

Die neuen Probenrotoren jetRotor von Genevac bestehen aus massivem Aluminium und bieten eine verbesserte Wärmeübertragung. Zusammen mit Genevacs Kühlfalle Speed Trap ermöglichen die Rotoren höhere Durchsätze, eine sichere Aufbereitung von DNA-Proben, die Reinigung von Plasmiden, die Entfernung von fluoreszenzmarkierten Endgruppen, die Zellfraktionierung sowie Oligonukleotid- und Proteinfällung.



Die Konstruktion der neuen Kühlfalle Speed Trap verbessert die Leistungen von miVac-Geräten erheblich, indem sie Dämpfe zu Flüssigkeiten kondensiert, die Aufrechterhaltung eines starken Vakuums unterstützt und den Einengungsprozeß stark beschleunigt.

Impressum

LABORWELT (ISSN 1611-0854)
erscheint zweimonatlich im Verlag der

BIOCOM AG
Stralsunder Str. 58-59
D- 13355 Berlin
Tel./Fax: 030/264921-0 / 030/264921-11
eMail: laborwelt@biocom.de
Internet: www.biocom.de

Redaktion:
Dipl.-Biol. Thomas Gabrielczyk
Tel.: 030/264921-50

Anzeigenleitung:
Oliver Schnell
Tel.: 030/264921-45, eMail: o.schnell@biocom.de

Leserservice:
Angelika Werner
Tel. 030/264921-40

Bildtechnik und Layout:
Heiko Fritz

Graphik-Design:
Michaela Reblin

Druck
Mayer & Söhne, D- 86551 Aichach

Mitglieder der DECHEMA-Fachsektion Biotechnologie, der Österreichischen Gesellschaft für Biotechnologie ÖGBT, der Gesellschaft für Genetik GfG, der Deutschen Gesellschaft für Proteomforschung DGPF, des Verbandes Deutscher Biologen vdbiol, der Deutschen Gesellschaft für Neurogenetik DGNG, der Gesellschaft für Signaltransduktion STS, des Vereins zur Förderung der Nutrigenomforschung, der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie DGHM, des RiNA RNA-Netzwerkes sowie die Wissenschaftler des Nationalen Genomforschungsnetzes NGFN erhalten die Zeitschrift im Rahmen ihrer Mitgliedschaft.

Für einen regelmäßigen Bezug von LABORWELT ist eine kostenlose Registrierung unter www.biocom.de oder per Fax (siehe Seite 48) erforderlich.

Namentlich gekennzeichnete Beiträge stehen in der inhaltlichen Verantwortung der Autoren. Alle Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Ohne schriftliche Genehmigung der BIOCOM AG darf kein Teil in irgendeiner Form reproduziert oder mit elektronischen Systemen verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Druckauflage von 20.000 Exemplaren ist IVW-geprüft:



© BIOCOM AG, Berlin
® BIOCOM ist eine geschützte Marke der BIOCOM AG, Berlin

BIOCOM® AG

17.11.06: Datenintegration in der Bioinformatik, Hamburg
Info: Veronika Schulte, TuTech Innovation GmbH
(Tel.: +49-40-76629-6346, Fax: +49-40-76629-6349,
eMail: lifesciences@tutech.de, Web: www.tutech.de/qz)

20.-21.11.06: In-Situ-Sanierung, Frankfurt am Main
Info: DECHEMA e.V. (Tel.: +49-69-7564-129,
Web: www.dechema.de)

20.11.06: InnoPlanta Forum 2006 – Welchen Nutzen hat die Grüne Biotechnologie? Magdeburg
Info: (Web: www.innoplanta.com)

22.11.06: Medizintechnik-Forum Rhein-Neckar – Online Image Guided Therapy, Heidelberg
Info: Petra Nellen, Universität Heidelberg
(Tel./Fax: +49-62121-54-78-18/-19,
eMail: nellen@uni-hd.de,
Web: www.akademie-fuer-weiterbildung.de)

23.-24.11.06: Sicherheit bei Arbeiten in gentechnischen Anlagen, Offenbach am Main
Info: Monika Öttl, Umweltinstitut Offenbach
(Fax: +49-69-823-493, eMail: mail@umweltinstitut.de,
Web: www.umweltinstitut.de)

23.11.06: Konstruktionswerkstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen, Göttingen
Info: Kompetenznetz RIKO (Tel.: +49-551-49-607-40,
eMail: info@riko.net, Web: www.riko.net)

23.-24.11.06: Bioenergie – Energie aus Biomasse – Biogas, Flüssigkraftstoffe, Festbrennstoffe, Bad Staffelstein
Info: Heike Trum/Eckardt Günther, OTTI Bereich Erneuerbare Energien (Tel.: +49 941 29688-23, eMail: heike.trum@otti.de,
Web: <http://www.otti.de/guenther/buh2576.html>)

23.-24.11.06: Technologie-Seminar Membrantrennverfahren in der Lebensmitteltechnik und in biopharmazeutischen Prozessen, Freising-Weihenstephan
Info: Sabine Becker, TU München, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL)
(Tel./Fax: +49-8161-714205/-384,
eMail: sabine.becker@wzw.tum.de,
Web: www.technologieseinar2005.de)

23.11.06: Technologieseminar: Laseranwendungen im Life Science-Bereich, Göttingen
Info: Petra Wallenta, Coherent GmbH, Göttingen
(Tel.: +49-89 89407-170,
eMail: Petra.Wallenta@coherent.com,
Web: www.coherent.com)

24.-25.11.06: Workshop Genlabor & Schule III, Berlin-Buch
Info: GBM (Tel.: +49-69-660-567-0,
eMail: info@genlabor-schule.de, Web: http://www.gbm-online.de/Arbeitskreise/Ak0e/workshop_genlabor06.htm)

25.-26.11.06: 5. NGFN-Meeting, Heidelberg
Info: Projektmanagement NGFN
(Tel./Fax +49-228-3821-331/-332, eMail: pm-ngfn@dlr.de,
Web: www.pt-it.de/ngfn/dkzf/contact.php)

27.-28.11.06: Future Developments of NBEs and Regulatory Requirements – Impact on Biopharmaceutical Manufacturing, Wien (A)
Info: Barbara Ulreich, ÖGBT
Tel./Fax: +43-1-80105-2811/-9311,
eMail: barbara.ulreich@vie.boehringer-ingenheim.com,
Web: www.oegbt.org)

27.-28.11.06: Technologieforum Diagnostik, Frankfurt am Main
Info: Dr. Andreas Scriba, VBU / DECHEMA e.V.
(Tel./Fax: +49-69-7564-124/-169,
eMail: scriba@dechema.de,
Web: www.v-b-u.org/tf/diag.htm)

28.11.06: Innovative Pflanzenzüchtung – Mendel-Gespräch, Berlin
Info: Prof. Dr. George Turner, Gregor-Mendel-Stiftung
(Tel.: +49-228-985-81-28, eMail: info@gregor-mendel-stiftung.de, Web: http://www.dhgp.de/media/xpress/genomxpress02_03/nc_mendel.html)

29.-30.11.06: EuroPLX 30 – Collaborative agreements in prescription drugs from clinical candidates to value added generics, Budapest (H)
Info: Dr. Norbert Rau, RauCon
(Tel./Fax: +49-6222-9807-0/-77,
eMail: nr@raucon.com, Web: www.europlx.com)

29.11.06: Smart Biomedical Systems, Regensburg
Info: Dr. Ute Steinbauer, Bayern Innovativ
Tel.: +49-911-20671-160, eMail: sb@bayern-innovativ.de,
Web: www.bayern-innovativ.de/smartbiosys2006)

30.11.-2.12.06: Biology of Disease (EMBL-Symposium), Heidelberg
Info: EMBL Heidelberg (eMail: faqsymp2006@embl.de,
Web: www.symposium.predocs.org)

01.12.06: Berlin Lecture on Molecular Medicine 2006 – Nuclear Cloning, Embryonic Stem Cells and Cell Therapy: Promise, Problems, Reality, Berlin
Info: Meino Alexandra Gibson, MDC, Berlin
(Tel./Fax +49-30-9406-3133/-3819,
eMail: gibson@mdc-berlin.de, Web: www.mdc-berlin.de)

03.-06.12.06: 1. Ringberg-Kolloquium Self-Organization and Morphogenesis in Biological Systems, Tegernsee
Info: (Web: www.nature.com/ncb/meetings/ringberg)

04.-05.12.06: 6. Internationale Escotinus-Fachtagung „Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology and Risk Management“, Köln
Info: Monika Stratmann, Akademie Fresenius
(Tel./Fax: +49-231-75896-48/-53,
eMail: mstratmann@akademie-fresenius.de,
Web: www.akademie-fresenius.de/1823)

05.12.06: Biokorrosion und Verhinderung mikrobieller Korrosion in Wasserkreisläufen, Essen
Info: Sule Ramzi, Haus der Technik e.V., Essen
(Tel./Fax: +49-201-1803-345/-346,
eMail: information@hdt-essen.de, Web: www.hdt-essen.de)

05.12.06: TÜV für Patente – IP Due Diligence-Prüfungen im Bereich der Biotechnologie, Luckenwalde
Info: bbb e.V. (Tel./Fax: +49-3302-202-1254/-1258,
eMail: bbb@biotech-hennigsdorf.de,
Web: www.ip-campenhausen.de)

05.-06.12.06: Global Imaging Summit 2006: The Application of Cellular and Molecular Imaging in Drug Discovery, Zürich (CH)
Info: informa Life Sciences (Tel.: +44-20-7017-7481,
eMail: registrations@informa-ls.com,
Web: www.informa-ls.com/imaging)

06.12.06: Vakzine – Innovative Strategien für Prävention und Therapie, München
Info: Forum MedTech Pharma e.V.
(Tel./Fax: +49-911-20671-330/-788,
eMail: info@forum-medtech-pharma.de,
Web: www.forum-medtech-pharma.de)

31.01.-03.02.07: Pharmacology and Molecular Mechanisms Group – 28th Winter Meeting, Berlin
Info: Michaela M. Langer, Max-Delbrück-Centrum, Berlin
(Tel./Fax: +49-30-9406-3720/-2206,
eMail: langer@mdc-berlin.de,
Web: <http://www.mdc-berlin.de/pamm2007/>)

27.02.-01.03.07: MEDTEC 2007, Stuttgart
Info: (Web: www.medtecshow.com)

BOOK YOUR SPACE NOW!!

6th INTERNATIONAL

BIO FORUM & BIO EXPO JAPAN

ASIA'S LARGEST BIO EVENT

600 exhibitors from 20 countries!
250 sessions/presentations at Conference!
20,000 visitors from worldwide!



Dates : June 20 (Wed) – 22 (Fri), 2007

Venue : Tokyo Big Sight, Japan

Organised by : Reed Exhibitions Japan Ltd.

Official Sponsors : *nature* 

For More Information

www.bio-expo.jp

Organised by

 **Reed Exhibitions**

BIO FORUM & BIO EXPO JAPAN Show Management Reed Exhibitions Japan Ltd.
18F Shinjuku-Nomura Bldg., 1-26-2 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-0570, Japan
TEL:+81-3-3349-8509 FAX:+81-3-3349-4922 E-mail:bioexpo@reedexpo.co.jp



on target. every time.



ShortCut™ RNAi Kit

NOVEL TECHNOLOGY TO TARGET THE RIGHT GENE FASTER.

- From DNA template to transfection in just 1 day
- Heterogeneous population of siRNA ensures effective silencing of target gene
- Eliminates trial and error approach of synthetic siRNA

The ShortCut™ RNAi Kit is a new system for the *in vitro* generation of siRNA mixtures for RNAi experiments in mammalian cells. The kit includes reagents for both high-yield *in vitro* transcription of large dsRNA and subsequent processing into a heterogeneous population of siRNA by digestion with ShortCut RNase III (also available separately) in a novel reaction buffer containing manganese.

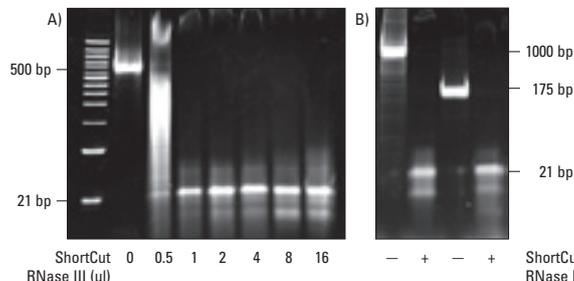
ORDERING INFORMATION:

ShortCut RNAi Kit	available separately:
E2450S 100 transfections	ShortCut RNase III
	M0245S 130 units (100 µl)
	M0245L 650 units (500 µl)
	TransPass R1 and R2 RNA Transfection Reagents
M2551S TransPass R1 (polyamine-lipid)	
M2552S TransPass R2 (two component)	

INTERNET-BESTELLUNGEN, NEUIGKEITEN UND TECHNISCHE INFORMATIONEN. www.neb-online.de

Ihr zuverlässiger Partner für die Molekularbiologie:

- **New England Biolabs GmbH**
Frankfurt/Main Deutschland Tel. 0800/BIOLABS (246-5227) Fax 0800/BIOLABX (246-5229) email: info@de.neb.com
- **New England Biolabs Inc.**
Ipswich, MA USA 1-800-NEB-LABS Tel. (978) 927-5054 Fax (978) 921-1350 email: info@neb.com internet: www.neb.com



siRNA production by ShortCut RNase III: (A) Varying amounts of ShortCut RNase III were incubated with 2 µg of a 500 bp dsRNA for 20 minutes. (B) dsRNA fragments (1 kb and 175 bp) were digested with ShortCut RNase III. Digests were analyzed by 20% TBE polyacrylamide gel electrophoresis.

GFP Silencing in COS-7 Cells:

COS-7 cells co-transfected with a plasmid expressing GFP in the absence (control) or the presence of 30 ng (4 nM) of GFP siRNA prepared using the ShortCut RNAi Kit. Cells were photographed 48 hours post-transfection.

