

Klaus-Tilmann Meinhof
Dr. med.

Funktionelle Genomanalyse des zellulären Cholesterinhaushalts durch ein RNA-Interferenz-basiertes Hochdurchsatz-Screening.

Fach/Einrichtung: Humangenetik
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Heiko Runz

Der Cholesterinstoffwechsel hat eine große klinische Bedeutung, da Störungen in seiner Regulation das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen vergrößern. Trotz intensiver Forschung sind wichtige Bereiche wie der intrazelluläre Transport des aufgenommenen Cholesterins noch unzureichend charakterisiert. Bekannt ist, dass zahlreiche funktionell weitgehend unbekannte Gene in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt der zellulären Umgebung differenziell exprimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methodik zur funktionellen Charakterisierung solcher Genkandidaten mit siRNA-Microarrays im Rahmen eines Mikroskop-basierten Hochdurchsatzscreenings. Aufbauend auf etablierten Verfahren der Zellkultur gelang es, Zellen in speziellen gekammerten Objektträgern zunächst unter standardisierten Bedingungen zu kultivieren und dann sowohl Experimente als auch abschließende quantitativ-mikroskopische Bildakquisition in diesen Objektträgern weitgehend zu automatisieren. Dies eröffnet für ein funktionelles Genomscreening dieser Breite eine neue Dimension der Effizienz in Bezug auf Geschwindigkeit, Materialkosten und Personalaufwand.

Im Rahmen der Etablierung zeigten sich vielfältige Herausforderungen bei der Anpassung eines bisher manuell durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Assays auf eine automatisierte Hochdurchsatzplattform. Als Hauptproblem entpuppte sich die hohe Varianz im Ausmaß des erreichten siRNA-Knockdowns. Als Lösungsansatz für künftige Screenings wurde eine Erhöhung der Replikazahl beschrieben und eine Optimierung des Autofokus angeregt.

Mit dem zum damaligen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Autofokus konnte unsere Methodik über die Auswertung der Kontrollgene validiert werden. Es zeigte sich eine reproduzierbare und signifikante Änderung des gemessenen Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der verwendeten Kontroll-siRNA. Diese neue und leistungsfähige Hochdurchsatzmethodik ist damit für unseren Cholesterinstoffwechsel-Assay erstmals etabliert. In der Zwischenzeit wurde die praktische Anwendbarkeit der Methode durch die Veröffentlichung der Ergebnisse eines weiteren Hochdurchsatzscreenings belegt. Bei der derzeitigen raschen technologischen Entwicklung im Bereich der digitalen Fluoreszenzmikroskopie sind in der Zukunft vielversprechende Anwendungen dieser Methodik zu erhoffen.