

MIQE-Guidelines

RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik

CHRISTIANE BECKER, IRMGARD RIEDMAIER, MICHAEL W. PFAFFL
LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE, WISSENSCHAFTSZENTRUM WEIHENSTEPHAN,
TU MÜNCHEN

Die Qualität des Probenmaterials, also der Gesamt-RNA, hat einen markanten Einfluss auf die Richtigkeit der quantitativen RT-PCR. Die Überprüfung der RNA-Qualität vor einer Expressionsmessung ist unabdingbar, um verlässliche RT-qPCR-Expressionsergebnisse zu erhalten.

The integrity of total RNA has a distinct influence on the accuracy of RT-qPCR. Quality assessment is an essential step for the evaluation of reliable results in gene expression analysis.

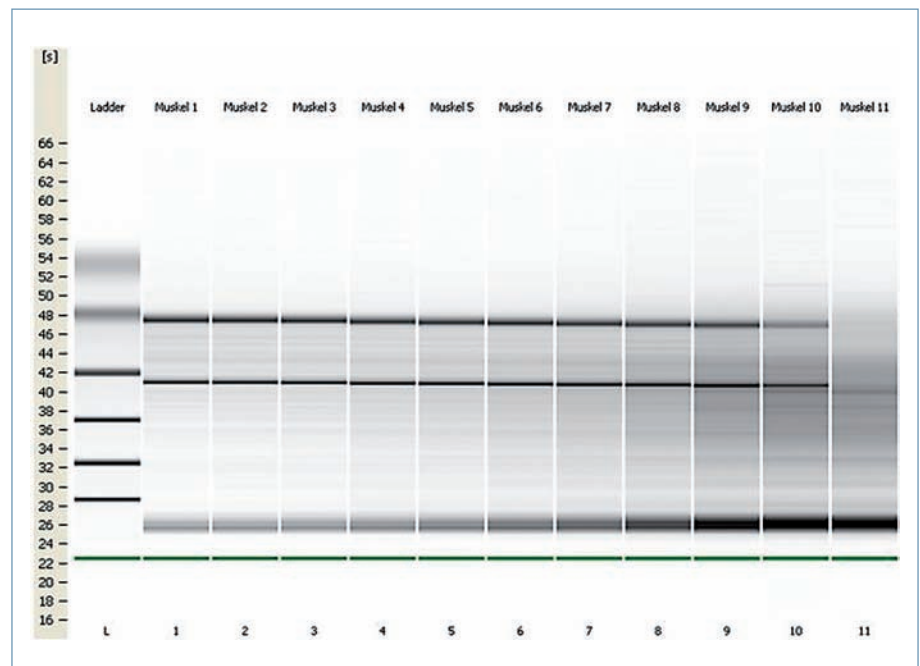
■ Die Messung von RNA-Expressionsprofilen hat sich als hilfreich erwiesen, um den physiologischen Zustand einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erfassen. Die RNA ist sehr empfindlich und durch die ubiquitär vorkommenden Nukleasen der ständigen Gefahr einer Degradierung unterworfen. Diese Gefahr muss vor allem während der Prozessierung (Probennahme, Lagerung, Extraktion etc.) beachtet und durch entsprechende Maßnahmen, wie sauberes Arbeiten mit Handschuhen, Stabilisierung der RNA sowie Dekontaminierungsmaßnahmen im Labor, minimiert werden. Zusätzlich empfiehlt sich die Überprüfung der RNA-Qualität vor der finalen Expressionsmessung durch RT-qPCR oder Mikroarrays. Wie auch in den kürzlich publizierten MIQE-Guidelines (*Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) stehen vor allem die Prä-PCR-Schritte im Zentrum des Interesses. Die MIQE-Guidelines sollen einen höheren Standard bezüglich der Prozessierung im Labor und der Dokumentation der Probenqualität gewährleisten. Es handelt sich hierbei um Empfehlungen, die den Wissenschaftlern eine Richtlinie geben sollen, welche Arbeitsvorgänge nötig, welche Qualitätskontrollen essenziell sind und wie die Genexpressionsdaten publiziert werden sollen. Dadurch soll anderen Forschergruppen die Möglichkeit gegeben werden, die Methode zu reprodu-

zieren und sich auf die Glaubwürdigkeit der Daten zu verlassen [1].

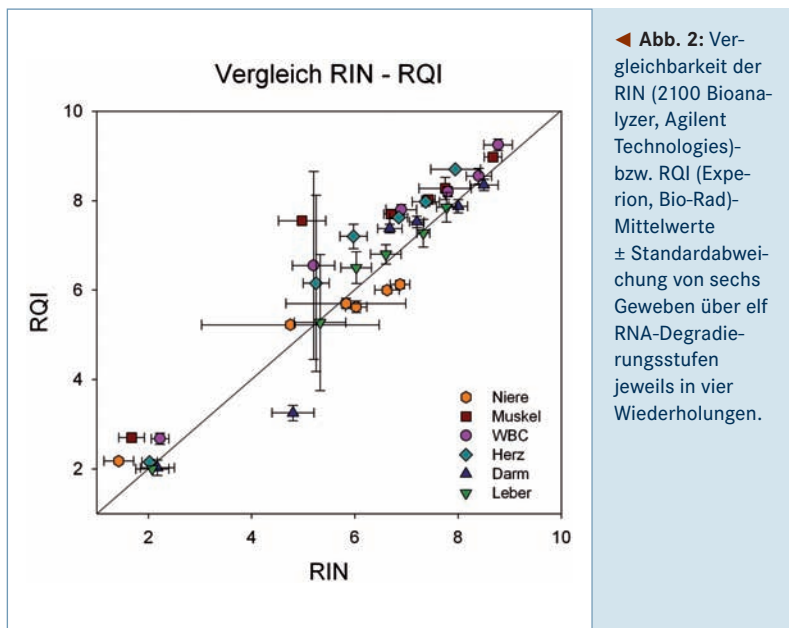
Integrität der Gesamt-RNA

Die klassische Qualitätsmessung der Gesamt-RNA erfolgt über die Betrachtung der Agarose-

se-Gelelektrophorese der Gesamt-RNA, im Wesentlichen der ribosomalen RNA (rRNA), welche die größte RNA-Fraktion darstellt (85–90 Prozent). Bei einer RNA-Probe von hoher Qualität geht man von einem 28S/18S-rRNA-Verhältnis von 2,0 aus. Die subjektive Abschätzung der RNA-Qualität durch die Auswertung eines Gels ist jedoch stark abhängig von der Einschätzung und Erfahrung des Einzelnen und von Forscher zu Forscher nur bedingt vergleichbar. Zur Standardisierung sollte deshalb auf automatisierte Kapillarelektrophorese durch die Lab-on-Chip-Technologie zurückgegriffen werden. Auf dem Markt sind verschiedene Lab-on-Chip-Instrumente wie der 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) und der Experion (Bio-Rad) zur Überprüfung der RNA-Integrität erhältlich. Mithilfe der Kapillarelektrophorese werden die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie fragmentierte RNAs



▲ **Abb. 1:** „Virtuelles Gel“ generiert durch die 2100 Bioanalyzer Software. Ergebnisse des Muskelgewebes in elf Degradierungsstufen (Spur L: RNA-Leiter; Spur 1: beste RNA-Qualität mit RIN = 7,80, bis Spur 11: schlechteste RNA-Qualität mit RIN = 2,5), gemessen auf dem NANO Eukaryote RNA-Chip (Agilent Technologies).



◀ **Abb. 2:** Vergleichbarkeit der RIN (2100 Bioanalyser, Agilent Technologies)- bzw. RQI (Experion, Bio-Rad)-Mittelwerte \pm Standardabweichung von sechs Geweben über elf RNA-Degradierungsstufen jeweils in vier Wiederholungen.

der Größe nach aufgetrennt, visualisiert und in einem Elektropherogramm sowie als „virtuelles Gelbild“ dargestellt (**Abb. 1**). Zusätzlich zu dem 28S/18S-rRNA-Verhältnis generieren beide Systeme einen Zahlenwert von 1 bis 10, der die Einstufung der RNA-Integrität vereinfachen soll. Der Bioanalyser bedient sich der *RNA Integrity Number* (RIN) und der Experion dem *RNA Quality Index* (RQI). Ein Wert von 10 repräsentiert eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität, und 1 steht für komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität [2].

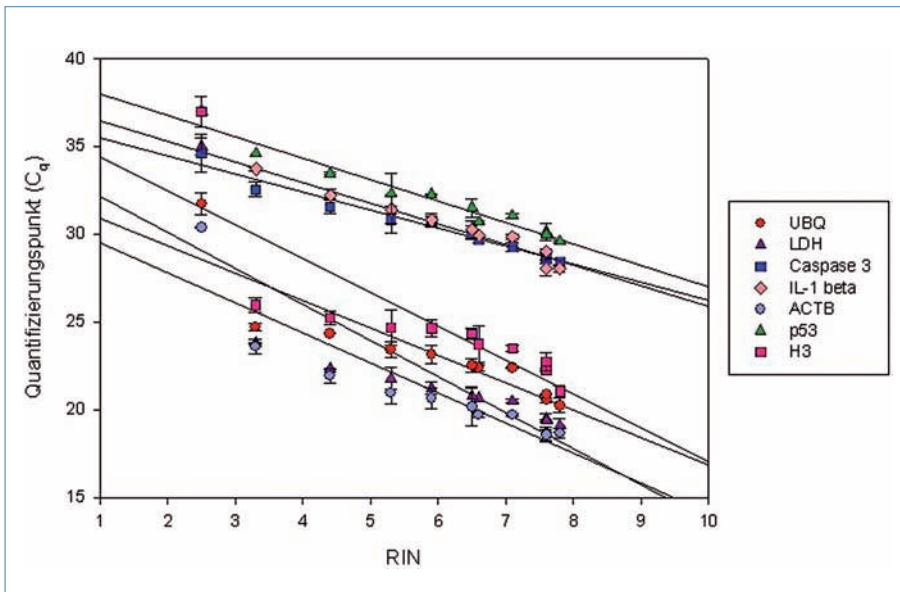
2100 Bioanalyser und Experion im Vergleich

In einer Studie wurden der 2100 Bioanalyser und Experion hinsichtlich der RIN- und RQI-Algorithmen zur Bestimmung der RNA-Qualität sowie deren Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Linearität der Messbereiche verglichen. Bezüglich der Sensitivität und der Reproduzierbarkeit zeigte der Experion verglichen mit dem 2100 Bioanalyser leicht bessere Ergebnisse, was auf die Automatisierung der Chipvorbereitung zurückgeführt werden kann. Hinsichtlich der Linearität zeigte der 2100 Bioanalyser bessere Korrelationen. Vor allem im mittleren und unteren RNA-Qualitätsbereich misst der Bioanalyser genauer (**Abb. 2**). Im Großen und Gan-

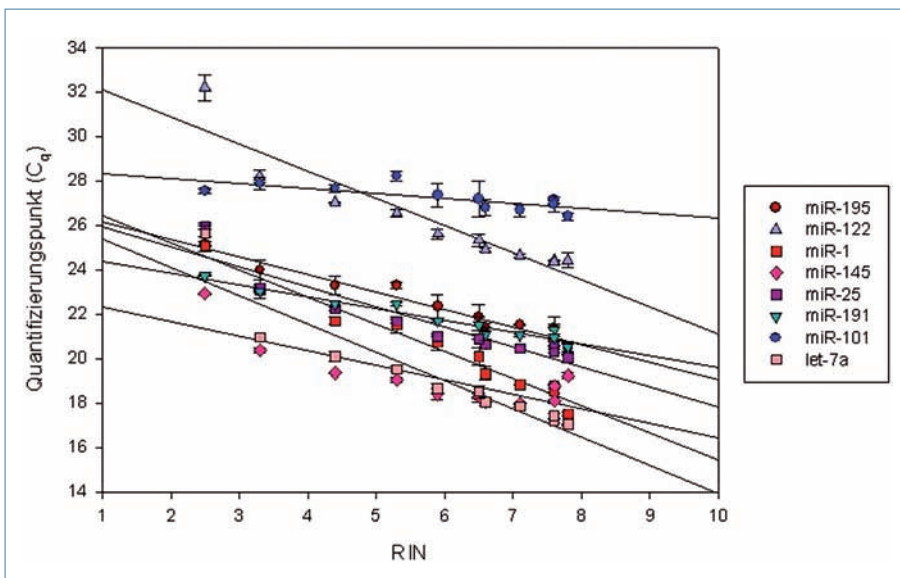
zen sind beide Geräte sehr vergleichbar und gut geeignet, um die Qualität von RNA zuverlässig und schnell zu bestimmen [3].

Konzentrationsbestimmung von miRNAs

Die Messung der Integrität sollte auch in die Routineanalyse bei neuen Applikationen, wie z. B. die Analytik von microRNAs (miRNAs) eingeführt werden. Bei miRNAs handelt es sich um kleine, regulatorische RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 bp. Seit deren Entdeckung im Jahr 1993 ist das analytische Interesse immer weiter angestiegen. Insbesondere in der klinischen Diagnostik sind Expressionsprofile von miRNAs von Nutzen, da diese als Biomarker für die Früherkennung bestimmter Krankheiten, vor allem verschiedener Krebsarten, dienen können [4, 5]. Auch miRNAs zählen zur Gruppe der Nukleinsäuren und ihre Expression wird daher mit den gleichen analytischen Methoden quantifiziert wie auch die der mRNA. Bereits bei der Konzentrationsbestimmung der miRNAs muss man sich jedoch anderen analytischen Herausforderungen stellen. Mit den konventionellen photometrischen Methoden ist es nicht möglich, unterschiedliche RNA-Fractionen in einem Extrakt zu erfassen. Eine der wenigen Möglichkeiten, die Konzentration der miRNA zu messen, bietet



▲ **Abb. 3:** Lineares Verhalten der mRNA-Expression, gemessen in Muskelgewebe über mehrere Degradierungsstufen mit höchst signifikanten Korrelationen zwischen dem Quantifizierungspunkt Cq und RIN (bei allen sieben mRNAs ist $p < 0,001$; mittlere Steigung = 1,521, mittlere $r^2 = 0,837$).



▲ **Abb. 4:** Lineares Verhalten der miRNA-Expression, gemessen in Muskelgewebe über mehrere Degradierungsstufen mit höchst signifikanten Korrelationen zwischen dem Quantifizierungspunkt Cq und RIN (bei allen acht miRNAs ist $p < 0,001$; mittlere Steigung = 0,709, mittlere $r^2 = 0,835$).

der 2100 Bioanalyzer. Zusätzlich zur RNA-Qualitätsanalytik bietet dieses Gerät mit dem smallRNA-Chip die Möglichkeit, selektiv die Konzentration von miRNA in der Gesamtheit der kleinen RNAs (< 200 Basen) zu bestimmen. Die Ergebnisse werden als absolute Konzentration [pg], sowie als relativer Anteil an der Fraktion der kleinen RNAs [%] angegeben. In eigenen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits hier ein deutlicher Einfluss der Gesamt-RNA-Integrität besteht.

Bei der Messung der miRNA-Konzentration von Proben unterschiedlicher Qualität am Bioanalyzer konnte eine deutlich signifikante, negative Korrelation zwischen sowohl der absoluten als auch der relativen miRNA-Konzentration und dem RIN festgestellt werden. Durch die fortschreitende Degradierung kommt es zur Bildung kleiner RNA-Fragmente, die in den Messbereich des smallRNA-Chips fallen und dadurch zu einer Überschätzung des miRNA-Gehalts führen [6]. Die Konzentrationsmessung der miRNA am 2100

Bioanalyzer ist also nur verlässlich für Proben mit sehr guter bis guter Gesamt-RNA-Integrität. Daher wird empfohlen, die miRNA-Qualität nicht isoliert von der Gesamt-RNA zu betrachten, sondern alle RNA-Fractionen als Gesamtbild zu werten.

Genexpressionsanalytik von Nukleinsäuren

Die RT-qPCR ist eine sensitive und verlässliche Methode, um die Expressionsprofile von RNAs zu messen, und ist in den letzten Jahrzehnten zum Goldstandard in der Genexpressionsanalytik geworden. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Qualität von RNA-Proben einen deutlichen Einfluss auf die Durchführung der PCR hat [7, 8]. Wie in **Abbildung 3** dargestellt, konnten diese Ergebnisse durch eigene Experimente bestätigt werden [6]. Die mRNA-Expression sieben verschiedener Gene wurde in Proben mit unterschiedlichem Degradierungsstatus gemessen. Bei allen Genen zeigte sich eine höchst signifikante negative Korrelation zwischen RIN und dem Quantifizierungspunkt Cq.

Auch auf Ebene der miRNA zeigt der Degradierungsgrad einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der RT-qPCR. In **Abbildung 4** sind Ergebnisse einer Expressionsmessung von acht verschiedenen miRNAs dargestellt. Auch hier kann eine höchst signifikante, negative Korrelation zwischen RIN und Cq beobachtet werden. Auffallend ist, dass die Steigung der Korrelationen geringer sind, und somit der Einfluss der Degradierung sich bei den miRNAs nicht so markant, aber trotzdem hoch signifikant ($p < 0,001$), präsentiert.

Zusammenfassung

Es zeigt sich also, dass sowohl die PCR der mRNA als auch der miRNA durch die RNA-Integrität beeinflusst werden, die Leistungsfähigkeit der miRNA-Quantifizierung jedoch in geringerem Ausmaß beeinträchtigt wird als die der mRNA-Quantifizierung. Durch geeignete Normalisierungsstrategien in der Datenauswertung lässt sich der negative Einfluss der RNA-Qualität zum Teil eliminieren, trotzdem besteht bei Proben mit einem RIN < 5 die Gefahr von nicht verlässlichen Ergebnissen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Qualität der Gesamt-RNA bei jeglichen Genexpressionsexperimenten sowohl in der Vorbereitung als auch in der eigentlichen Durchführung beachtet werden sollte und bei allen Prozessierungsschritten ein besonde-

res Augenmerk auf die Gefahr der Degradierung gelegt werden muss. ■

Literatur

- [1] Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 4:611–622
- [2] Schroeder A, Mueller O, Stocker S et al. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3
- [3] Riedmaier I, Bergmaier M, Pfaffl MW (2009) Comparison of two available platforms for the determination of RNA quality. *Electronic J Biotechnol* (im Druck)
- [4] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 30:10513–10518
- [5] Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:259–269
- [6] Becker C, Hammerle-Fickinger A, Meyer HHD et al. (2009) mRNA and microRNA quality control for qRT-PCR analysis. *Methods* (im Druck)
- [7] Fleige S, Walf V, Huch S et al. (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 19:1601–1613
- [8] Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2-3:126–139

Korrespondenzadresse:

Christiane Becker
Lehrstuhl für Physiologie, Weihenstephan
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
D-85384 Freising
Tel.: 08161-71-3867
Fax: 08161-71-4204
Christiane.Becker@wzw.tum.de

AUTOREN



v. l. n. r.: Michael W. Pfaffl, Christiane Becker, Irmgard Riedmaier

Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael W. Pfaffl am Lehrstuhl für Physiologie an der TUM Weihenstephan beschäftigt sich seit Mitte der 90er-Jahre mit der absoluten Quantifizierung spezifischer mRNAs via kompetitiver RT-PCR sowie Real-Time-RT-PCR. Seit Beginn 2000 wurde der Schwerpunkt auf die relative Quantifizierung, die Optimierung der Quantifizierungsstrategie und auf die Entwicklung von Software-Algorithmen und Auswertesoftware gelegt. Im Weiteren stehen das Qualitätsmanagement der PCR und die MIQE-Richtlinien im Vordergrund.