

Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Hilger Ropers
Abteilung: Prof. Dr. med. Hans-Hilger Ropers
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Berger

Expressionsanalysen mit cDNS-Mikroarrays
—
**Aufklärung der Pathogenesemechanismen einer seltenen
Augenkrankheit**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades Doctor rerum medicarum
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Sandra Prietz
aus: Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Detlev Ganten
Koreferent: Prof. Dr. med. Burghardt Wittig

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. April 2003

Meinem Mann Wolfgang Prietz

Exploration means looking around, observing, describing and mapping undiscovered territory, not testing theories or models. The goal is to discover things we neither knew nor expected, and to see relationships and connections among the elements, whether previously suspected or not. It follows that this process is not driven by hypothesis and should be as model-independent as possible. We should use the unprecedented experimental opportunities that the genome sequence provide to take a fresh, comprehensive and openminded look at every question in biology. If we succeed, we can expect that many of the new models that emerge will defy conventional wisdom.

Patrick O. Brown, 1999

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 1 |
| 2 | EINLEITUNG..... | 2 |
| 2.1 | Expressionsanalysen | 2 |
| 2.1.1 | Analyse der Genexpression durch subtraktiv-suppressive Hybridisierung | 3 |
| 2.1.2 | Analyse der Genexpression mit cDNS-Mikroarrays..... | 5 |
| 2.2 | Die Technologie der cDNS-Mikroarrays | 7 |
| 2.2.1 | Herstellung der Mikroarrays..... | 7 |
| 2.2.2 | Herstellung und Markierung der Targets | 10 |
| 2.2.3 | Hybridisierung und Waschen..... | 13 |
| 2.2.4 | Bildgewinnung und Datenanalyse..... | 14 |
| 2.2.5 | Normalisierung und Kontrollen..... | 15 |
| 2.2.6 | Clusteranalyse..... | 15 |
| 2.3 | Anwendungsmöglichkeiten der Mikroarray-Technologie | 17 |
| 2.3.1 | Zellbiologische Grundlagenforschung mit Mikroarrays | 17 |
| 2.3.2 | Verwendung von Mikroarrays zur Beantwortung medizinischer Fragestellungen..... | 17 |
| 2.3.3 | Mikroarray-basierte Expressionsanalysen von Augenerkrankungen | 18 |
| 2.4 | Aufbau, Funktion und Erkrankung der menschlichen Netzhaut..... | 19 |
| 2.4.1 | Die menschliche Netzhaut | 19 |
| 2.4.2 | Die Norrie Krankheit – eine degenerative Augenerkrankung..... | 20 |
| 2.5 | Fragestellung | 24 |
| 3 | MATERIAL | 25 |
| 3.1 | Biologisches Material | 25 |
| 3.1.1 | cDNS Klone | 25 |
| 3.1.2 | Gesamt-RNS aus Mausaugen..... | 26 |
| 3.1.3 | Vollständige cDNS..... | 27 |
| 3.1.4 | SMART-amplifizierte cDNS..... | 27 |
| 3.1.5 | cDNS-Pools | 28 |
| 3.1.6 | Produkte der cDNS-Subtraktionen..... | 28 |
| 3.2 | Enzyme | 29 |
| 3.3 | Kits | 29 |
| 3.4 | Längenstandards, Vektor und Primer | 30 |
| 3.4.1 | Nukleinsäure Längenstandards | 30 |
| 3.4.2 | Vektor | 30 |
| 3.4.3 | Primer..... | 30 |
| 3.5 | Fein- und Biochemikalien..... | 31 |
| 3.6 | Lösungen und Puffer..... | 33 |
| 3.7 | Verbrauchsmaterialien | 36 |
| 3.8 | EDV-Programme..... | 37 |
| 3.9 | Geräte | 37 |
| 4 | METHODEN | 38 |
| 4.1 | Herstellung von cDNS-Mikroarrays..... | 38 |
| 4.1.1 | Anlegen von Dauerkulturen | 38 |
| 4.1.2 | Generierung der Elemente | 38 |
| 4.1.3 | Prozessierung der Objektträger | 40 |
| 4.1.4 | Transfer der PCR-Produkte auf Glasobjektträger..... | 41 |
| 4.2 | Herstellung der Targets..... | 41 |
| 4.2.1 | Quantifizierung von Gesamt-RNS..... | 41 |
| 4.2.2 | Zusatz von Pflanzen-mRNS..... | 42 |
| 4.2.3 | Verfahren der Markierung ohne Amplifikation..... | 42 |
| 4.2.4 | Verfahren der Markierung mit Amplifikation..... | 46 |
| 4.3 | Hybridisierung und Waschen | 51 |
| 4.3.1 | Hybridisierung..... | 51 |
| 4.3.2 | Waschen..... | 52 |
| 4.4 | Bildgewinnung und Datenanalyse..... | 53 |
| 4.4.1 | Bildgewinnung | 53 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.4.2 | Datenanalyse..... | 53 |
| 4.5 | Clusteranalyse | 54 |
| 5 | ERGEBNISSE | 55 |
| 5.1 | Optimierung wesentlicher Schritte der cDNS-Mikroarray Technologie | 55 |
| 5.1.1 | Vergleich verschiedener Oberflächenmodifikationen..... | 56 |
| 5.1.2 | Vergleich verschiedener Hybridisierungslösungen | 58 |
| 5.1.3 | Das Set der Kontrollen..... | 59 |
| 5.1.4 | Die Normalisierung | 60 |
| 5.2 | Vergleich von Nylon-Arrays mit Glas-Mikroarrays | 62 |
| 5.2.1 | Analyse der Vorwärts-Subtraktionsbank..... | 62 |
| 5.2.2 | Analyse der Reversen-Subtraktionsbank..... | 65 |
| 5.3 | Charakterisierung von Subtraktionsbanken durch cDNS-Mikroarrays | 65 |
| 5.3.1 | Differenzielles Präscreening | 65 |
| 5.3.2 | Redundanz-Screening | 66 |
| 5.3.3 | Hybridisierung von kompletten cDNS | 68 |
| 5.3.4 | Bestätigung der differentiellen Expression..... | 70 |
| 5.4 | Optimierung für Expressionsanalysen mit limitiertem Augenmaterial | 70 |
| 5.4.1 | Vergleich verschiedener Markierungsmethoden..... | 70 |
| 5.4.2 | Vergleich von Targets unterschiedlicher Komplexität und Anreicherung | 75 |
| 5.5 | Genexpressionsstudie in der ND-Knockout Maus | 77 |
| 5.5.1 | Expressionsanalyse basierend auf RNS-Targets | 77 |
| 5.5.2 | Expressionsanalyse mit SMART-amplifizierten Targets | 80 |
| 6 | DISKUSSION | 85 |
| 6.1 | Optimierung wesentlicher Schritte der cDNS-Mikroarray Technologie | 85 |
| 6.2 | Vergleich von cDNS-Mikroarrays mit Nylonfilter-Arrays als Screeningmethode | 87 |
| 6.3 | Differenzielles Screening der Subtraktionsbank | 88 |
| 6.4 | Optimierung für Expressionsanalysen mit limitiertem Ausgangsmaterial | 89 |
| 6.5 | Komplexität und Anreicherung der Targets | 91 |
| 6.6 | Analyse der Genexpression in ND-Mäusen..... | 92 |
| 6.6.1 | Identität der differentiell exprimierten Gene | 93 |
| 6.6.2 | Analyse der Genexpression basierend auf Einzeltieren | 94 |
| 6.6.3 | Änderung der Genexpression während der Krankheitsprogression..... | 94 |
| 6.7 | Ausblick..... | 98 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 100 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 112 |
| 9 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 115 |
| 10 | TABELLENVERZEICHNIS..... | 116 |
| 11 | ANHANG | 117 |
| 11.1 | Haushaltsgene | 117 |
| 11.2 | Retina-spezifische und Apoptose-relevante Gene | 119 |
| 11.3 | Pools für das Redundanz-Screening und Anzahl detektierter Elemente..... | 120 |
| 11.4 | Hybridisierung vollständiger cDNS und Anzahl detektierter Elemente | 121 |
| 11.5 | Klone, die bestätigt differentiell exprimierte Gene repräsentieren | 121 |
| 11.6 | Expressionsmuster der RNS-Targets im Zeitverlauf | 122 |
| 11.7 | Expressionsmuster der SMART-Targets im Zeitverlauf | 124 |
| 12 | WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE..... | 128 |
| 12.1 | Kongressbeiträge | 128 |
| 12.2 | Publikationen..... | 129 |
| 12.3 | Array-Kurse | 129 |
| 13 | DANKSAGUNG | 130 |

1 ZUSAMMENFASSUNG

cDNS-Mikroarrays stellen ein modernes Verfahren zum Studium der Genexpression dar, die eine vergleichende Analyse des transkriptionellen Zustandes einer Zelle oder eines Gewebes ermöglichen. Tausende von Genen können dadurch simultan in ihrer Expressionsstärke erfasst werden. Gleichzeitig werden komplexe genetische Veränderungen besonders gut visualisiert. Die biologische Fragestellung dieser Arbeit war darauf ausgerichtet, Expressionsanalysen an limitiertem Ausgangsmaterial von Knockout-Mäusen mit einer seltenen Augenkrankheit durchzuführen. Dabei handelt es sich um die Norrie Krankheit, eine X-chromosomal-rezessive Erkrankung, die durch degenerative Veränderungen in der Netzhaut gekennzeichnet ist. Grundlage für die Expressionsanalysen stellte eine cDNS-Subtraktionsbank dar. Diese war insbesondere für gering exprimierte Gene angereichert, die in den Augen von Norrie-Knockout Mäusen fehlen oder auf einem sehr geringen Niveau exprimiert sind. Eine effektive Screening Methode ermöglichte die Mikroarray-basierte Charakterisierung von über 3000 cDNS-Klonen aus dieser Bank. Die Vielzahl an identifizierten Photorezeptor-spezifischen Genen wurde durch zusätzliche Augen-spezifische und Apoptose-relevante Gene aus einer Klon-Sammlung vervollständigt. Dadurch waren parallele Expressionsanalysen mit über 5000 Elementen möglich. Zur Hybridisierung mußten fluoreszent markierte Targets hergestellt werden, wobei die sehr geringen Mengen an RNS – wie sie aus dem Auge einer Maus gewonnen werden können – eine besondere Schwierigkeit darstellten. Methodisch völlig unterschiedliche Verfahren wurden verglichen und dahingehend beurteilt ob sie die initialen Transkript-Verhältnisse aufrechterhalten. In einer umfangreichen Studie wurde die zeitliche Änderung der Genexpression während der Krankheitsprogression der Norrie Krankheit erfaßt. Die Augen-RNS von jeweils drei Tierpaaren (ND-Knockout und Wildtyp) von sieben verschiedenen Altersstadien (0,5 bis 24 Monate) wurden jeweils mit zwei methodisch unterschiedlichen Techniken fluoreszenzmarkiert und auf die Mikroarrays hybridisiert. Die sehr umfangreichen Datensätze wurden durch Clusteranalyse ausgewertet, wodurch zeitliche Veränderungen der Genexpression identifiziert und visualisiert werden konnten. Dadurch war es erstmalig möglich, pathogenetische Prozesse der Krankheitsprogression in ND-Mäusen auf Transkript-Niveau zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kontinuierliche Expression des ND-Gens eine wichtige Bedeutung für die funktionelle und strukturelle Integrität der retinalen Zell-Schichten, insbesondere für Photorezeptorzellen hat.