

2 EINLEITUNG

2.1 Expressionsanalysen

Das humane Genom wird in kurzer Zeit vollständig entschlüsselt sein [Collins *et al.*, 1998; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001]. Ziel ist es, die Sequenzabfolge aller Basenpaare zunächst von einzelnen Genen und dann von ganzen Genomen zu entziffern. Dadurch soll die Beziehung zwischen Ursache und Wirkung von Erbinformation und Eigenschaft des Organismus aufgedeckt werden. Im engeren Sinn sollen funktionelle Zusammenhänge zwischen Erbinformation, Umwelteinwirkungen und individuellem Gesundheitsstatus aufgeklärt werden, um daraus neue Diagnose- und Therapieformen entwickeln zu können. Durch die Genexpression wird die im Zellkern gespeicherte genetische Information in ein Genprodukt übertragen und somit phänotypisch manifestiert. Alle Vorgänge zur Neusynthese eines vollständigen, funktionellen Proteins, das von einem oder mehreren Genen kodiert wird, werden als Genexpression bezeichnet. Dies umfaßt die Transkription und post-transkriptionelle Modifizierungen, die Translation und post-translationale Modifizierungen. Nicht alle Gene eines Genoms werden gleichzeitig und gleich stark exprimiert. Einige Gene werden sehr selten oder nur kurzzeitig (transient), andere dagegen ständig (konstitutiv) exprimiert. Diese Expression unterliegt sehr komplexen Regulationsmechanismen, durch die sich die Zelle an ihre Umgebung anpaßt. Gesteuert wird dies durch viele räumlich und zeitlich unterschiedliche Faktoren, z.B. extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Bei der molekularen Analyse des Expressionsmusters wird zwischen klassischen und modernen Verfahren unterschieden. Klassische Verfahren wie das Northern Blotting, RNS *in situ* Hybridisierung oder RT-PCR zeichnen sich durch ihre hohe Sensitivität und Genauigkeit aus. Einen Nachteil stellt jedoch der hohe Zeitaufwand und die Schwierigkeit einer gleichzeitigen Analyse dar. Moderne Verfahren der Expressionsanalyse ermöglichen einen hohen Durchsatz und einen hohen Parallelisierungsgrad. Zur Analyse des gesamten Transkriptoms [Velculescu *et al.*, 1999; Devaux *et al.*, 2001] werden folgende Verfahren angewandt: serielle Analyse der Genexpression (SAGE) [Velculescu *et al.*, 1995], Makroarrays [Eickhoff *et al.*, 2000] und cDNS Mikroarrays [Schena *et al.*, 1995]. Um differenziell exprimierte Gene zu isolieren, kommen Methoden wie z.B. Differential Display [Liang *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1993], repräsentative Differenzanalyse (RDA) [Lisitsyn *et al.*, 1993; Hubank *et al.*, 1994] und subtraktiv-suppressive Hybridisierung (SSH) [Gurskaya *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999] zum Einsatz. Jedes dieser methodisch sehr

unterschiedlichen Verfahren bietet mit bezug auf die biologische Fragestellung besondere Vorteile. Die subtraktiv-suppressive Hybridisierung ermöglicht es, durch den Vergleich zweier Transkriptome differenziell exprimierte cDNS Fragmente anzureichern und zu isolieren. Dadurch können unbekannte und insbesondere niedrig exprimierte Gene identifiziert werden. Aus der Kombination der SSH mit cDNS-Mikroarrays ergibt sich eine äußerst leistungsfähige Technologie der Expressionsanalyse, die insbesondere die parallele Analyse schwach exprimierter Gene erlaubt [Yang *et al.*, 1999]. Die cDNS-Mikroarray Technik ermöglicht eine vergleichende Transkriptom Analyse, wobei simultan die Expressionsstärke von mehreren Tausend Genen erfaßt wird [Schena *et al.*, 1995; Zarrinkar *et al.*, 2001]. Komplexe genetische Veränderungen können besonders gut visualisiert werden. Nachteilig ist jedoch, dass sie nicht geeignet ist, sehr gering exprimierte Transkripte zu detektieren [Schena *et al.*, 1995]. Ebenso bedürfen Array-Experimente zur statistischen Absicherung mehrerer Wiederholungsexperimente [Lee *et al.*, 2000] und der Kontrolle mit einer unabhängigen Methode.

2.1.1 Analyse der Genexpression durch subtraktiv-suppressive Hybridisierung

Die subtraktiv-suppressive hybridisierung (SSH) ist eine effektive Methode, um Transkripte zu identifizieren, die in einer mRNS Population vorhanden, in einer anderen jedoch reduziert sind oder gänzlich fehlen. Im Wesentlichen vereint diese Technik eine Subtraktion und eine Normalisierung. Die Subtraktion reichert gleiche Transkripte aus Ziel- und Referenz-Population ab [Diatchenko *et al.*, 1999] und die Normalisierung gleicht die Häufigkeit der cDNS Fragmente aus [Gurskaya *et al.*, 1996]. Dabei wird die Sequenzkomplexität in mehreren, aufeinander folgenden Schritten erheblich verringert und differenziell exprimierte Sequenzen werden selektiv amplifiziert und bis auf das 1000fache angereichert. Die Wahrscheinlichkeit, auch selten vorkommende differenziell exprimierte cDNS zu erhalten, steigt dadurch erheblich [Gurskaya *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999; Tchernitsa *et al.*, 1999]. In der Abbildung 2.1 sind die wesentlichen Schritte der SSH dargestellt.

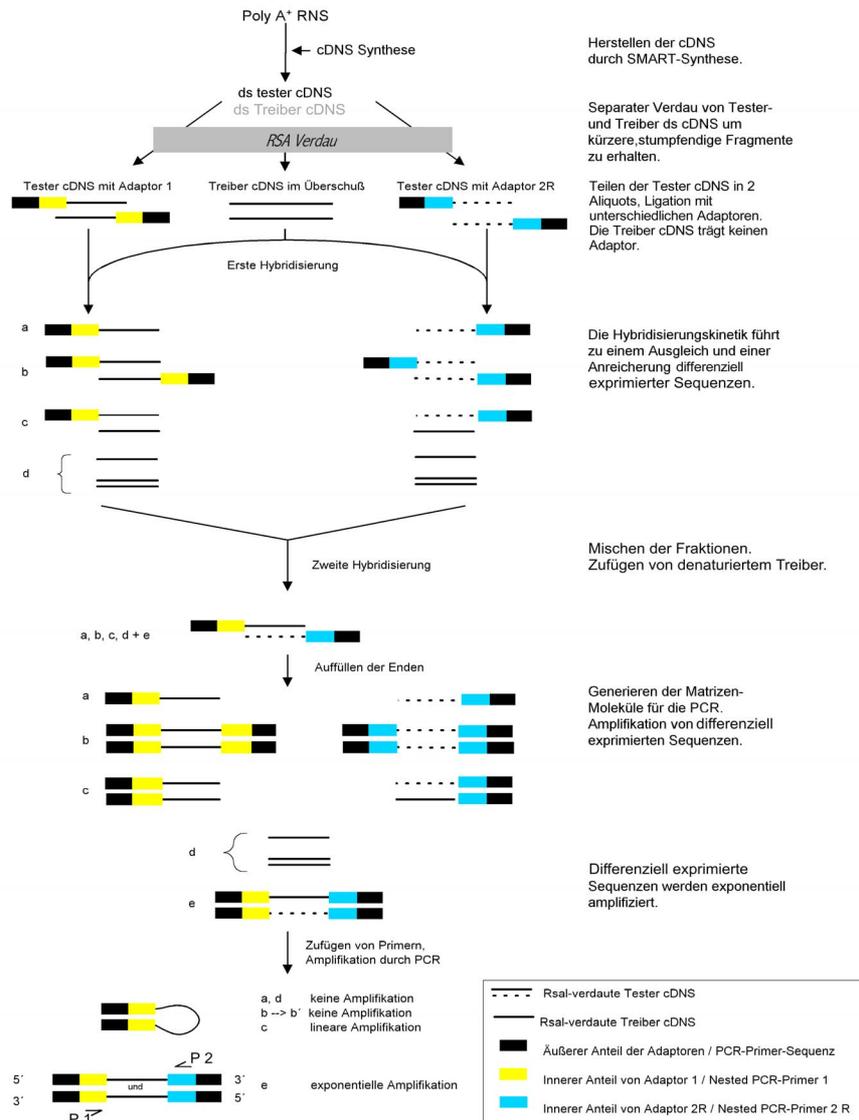


Abbildung 2.1: Prinzip der subtraktiv-suppressiven Hybridisierung.

Zunächst wird cDNS von den beiden zu vergleichenden mRNS-Populationen synthetisiert. Die cDNS, aus der spezifische Transkripte isoliert werden sollen, wird als "Tester" bezeichnet, die Referenz als "Treiber". Tester- und Treiber-cDNS werden mit einem Restriktionsenzym geschnitten, danach werden die Tester-Fragmente in zwei Aliquots aufgeteilt und mit zwei unterschiedlichen Adaptoren ligiert. In der ersten Hybridisierung wird zu jeder Fraktion des Testers ein Überschuss an denaturiertem Treiber zugefügt. Die Abbildung zeigt Typ a, b, c und d Moleküle. Typ a Moleküle werden signifikant für differenziell exprimierte Sequenzen angereichert. In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Fraktionen der ersten Hybridisierung vereint. Die Hybride der Typ a Moleküle vom Tester bilden nun neue Typ e Moleküle. Diese tragen unterschiedliche, einzelsträngige Adaptor-Sequenzen an den Enden. Erneut wird denaturierter Treiber zugesetzt, wodurch weiter für Typ e Moleküle angereichert wird. Als nächstes werden Typ e Moleküle durch das Primer-Paar P1 und P2 in der PCR amplifiziert. Typ a und d können aufgrund fehlender Primer-Bindungsstellen nicht amplifiziert werden. Typ c Moleküle werden linear amplifiziert. Typ b Moleküle bilden eine Pfannenstiel-ähnliche Struktur. Damit wird eine Amplifikation dieser Moleküle weitgehend unterdrückt. Nur Typ e Moleküle werden aufgrund zweier unterschiedlicher Adaptor-Sequenzen exponentiell amplifiziert [Diatchenko *et al.*, 1999].

2.1.2 Analyse der Genexpression mit cDNS-Mikroarrays

Als cDNS-Mikroarray bezeichnet man die systematische Anordnung von mehreren Tausend Gen-spezifischen cDNS-Sequenzen (Elemente¹) auf einer Matrix [Schena *et al.*, 1995]. Diese Matrix kann simultan mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Targets hybridisiert werden [Shalon *et al.*, 1996]. Die Targets repräsentieren die Gesamt-RNS, die aus Test- und Referenz-Zellen oder -Gewebe isoliert wurden. Das durch Hybridisierung auf den cDNS-Mikroarray erhaltene Signal ermöglicht eine Aussage über die relative Quantität eines bestimmten Transkripts. Die relative Transkript-Häufigkeit ist inhärent und basiert auf einem direkten Vergleich zwischen dem Test- und Referenz-Status. Somit ist eine interne Kontrolle praktisch für jede Messung vorhanden [Duggan *et al.*, 1999]. Werden die Targets nicht fluoreszent sondern radioaktiv markiert, so ist eine simultane Hybridisierung von Test- und Referenz-Target nicht möglich [Chen *et al.*, 1998]. Dann ist eine serielle oder parallele Hybridisierung erforderlich, die experimentell eine höhere Variabilität verursacht [Schuchhardt *et al.*, 2000]. Das Ergebnis einer Hybridisierung von Test- und Referenz-Target liefert Daten über die Expressionsstärke von mehreren Tausend Genen. Dazu wurden hochleistungsfähige Bildanalyse- und Datenverarbeitungsverfahren entwickelt [Chen *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1999].

Unabhängig davon, ob fluoreszent oder radioaktiv markierte Targets hybridisiert wurden, müssen die erzeugten Daten normalisiert werden [Eickhoff *et al.*, 1999a; Schuchhardt *et al.*, 2000]. Solch eine Normalisierung dient dem Zweck, Unterschiede in der Markierung und in der experimentellen Variabilität auszugleichen [Beissbarth *et al.*, 2000]. Normalisierte Datensätze können anschließend durch Clusteranalyse miteinander verglichen werden. Grundvoraussetzung der Clusteranalyse ist die Annahme, dass Transkripte mit einem biologischen Zusammenhang eine Ähnlichkeit in ihrem Expressionsmuster aufweisen [Eisen *et al.*, 1998; Getz *et al.*, 2000]. Gen-repräsentierende Elemente werden aufgrund der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters angeordnet [Ben-Dor *et al.*, 1999]. Je ähnlicher zwei Gene in ihrer Expression sind, desto näher beieinander werden sie angeordnet [Michaels *et al.*, 1998]. Ein Überblick über die gesamte Technik ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

¹ Als Elemente werden die bekannten, homogenen Populationen an cDNS-Molekülen bezeichnet, die auf dem cDNS-Mikroarray immobilisiert sind. Die unbekannte, heterogene Population, die in der mobilen Phase auf den cDNS-Mikroarray hybridisiert wird, bezeichnet man als Target [Phimister, 1999].

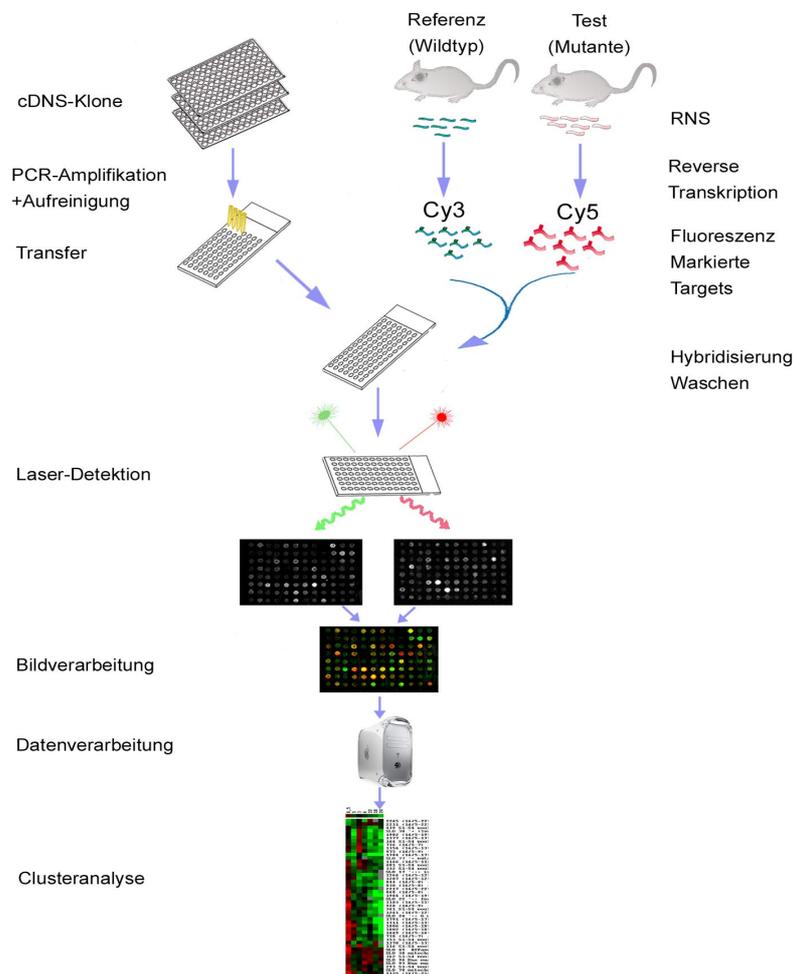


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der cDNS-Mikroarray Technologie.

Die Inserts von cDNS-Klonen werden durch PCR in 96er Mikrotiterplatten amplifiziert. Anschließend werden die PCR-Produkte aufgereinigt und resuspendiert. Mit Hilfe eines hochpräzisen Roboters wird ein Aliquot auf die Oberfläche von beschichteten Glasobjektträgern transferiert. Zur Herstellung der Targets wird die aus den Geweben einer Referenz- und einer Test-Maus isolierte Gesamt-RNS durch reverse Transkription mit Cy3- oder mit Cy5-dNTPs fluoreszent markiert. Die fluoreszenten Targets werden vereint und unter stringenten Bedingungen auf die Elemente des cDNS-Mikroarrays hybridisiert. Nicht ausreichend komplementäre und ungebundene Target-Moleküle werden durch mehrere Waschschrte mit ansteigender Stringenz von dem Mikroarray entfernt. Die in den hybridisierten cDNS-Molekülen inkorporierten Fluorochrome werden durch Laserlicht verschiedener Wellenlängen angeregt, so dass sie Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge emittieren, das durch ein konfokales Mikroskop und einen Photomultiplier gemessen wird. Anhand der detektierten Signale werden, basierend auf den Helligkeitsinformationen aus jedem Kanal, zwei separate, monochrome 16-bit Bilder generiert. Diese werden in eine spezielle Software importiert und nach einer Bildanalyse und einer virtuellen Überlagerung als Falschfarben-Bild dargestellt. Zusätzlich wird jedem Element die Information über die Klonidentität, der Genname, die Genidentifikations-Nummer, Intensitätswerte, die Normalisierungskonstante und der Konfidenzbereich der Datenanalyse zugeordnet. Das Ergebnis eines Hybridisierungs-Experimentes wird in Form von normalisierten Signalintensitäts-Quotienten (Cy5/Cy3) dargestellt. Signifikante Abweichungen von 1 (keine Expressionsunterschiede) zeigen eine höhere Genexpression (>1) oder eine verminderte Genexpression (<1) an. Diese Abweichungen werden jeweils auf die nicht veränderte Referenz bezogen. Die Ergebnisse von mehreren Experimenten (z.B. von einer Zeitreihe) werden anschließend durch Clusteranalyse analysiert.

2.2 Die Technologie der cDNS-Mikroarrays

2.2.1 Herstellung der Mikroarrays

2.2.1.1 Auswahl der Elemente

Die biologische Fragestellung bestimmt, welche genspezifischen Sequenzen auf den Mikroarray aufgetragen werden sollen. Die einzige Limitierung stellt die Verfügbarkeit an cDNS-Klonen dar [Duggan *et al.*, 1999]. Die Herstellung fängt bei der Selektion der Sequenzen an, wobei es prinzipiell zwei Möglichkeiten für die Auswahl gibt. Sie können entweder direkt aus Datenbanken ausgewählt werden, z.B. GenBank [Benson *et al.*, 1997], dbEST [Boguski *et al.*, 1993] und UniGene [Schuler *et al.*, 1996] oder sie stammen aus cDNS-Bibliotheken, die aufgrund von spezifischen Fragestellungen generiert wurden. Große Datenbanken wurden in umfangreichen Sequenzierprojekten generiert [Schuler *et al.*, 1991]. Dabei wurden ganze cDNS-Bibliotheken mit mehreren Zehntausend Klonen sequenziert und die Sequenzdaten in EST-Datenbanken zusammengefaßt. Ein einzelnes Gen kann durch eine Vielzahl von ESTs repräsentiert (hohe Redundanz) und in Clustern zusammengefaßt werden, sogenannten Genindizes [Schuler, 1997]. Die UniGene Datenbank repräsentiert hinsichtlich der informellen Basis eine ausgezeichnete Quelle, um Klone auszuwählen. Sie enthält eine zusammenfassende Darstellung relevanter Informationen über die Funktion eines speziellen Gens, seiner genomischen Lokalisation, Verbindungen zu anderen Datenbanken und Literaturzitaten. Das Ressourcen Zentrum des Deutschen Human Genom Projektes (RZPD) bietet einen sehr komfortablen Service, um Klone auszuwählen. Zwar sind solche Datenbanken sehr umfassend, jedoch nicht immer hinreichend für spezifische biologische Fragestellungen geeignet. So waren zum Beispiel 1999 nur 23 Klone verfügbar, die Retina-spezifische Gene der Maus repräsentierten. Eine weitere Problematik besteht in der teilweise unkorrekten Zuordnung der Sequenzen zu den physikalischen Klonen solcher Klonsammlungen [Halgren *et al.*, 2001].

2.2.1.2 Generierung der Elemente und Trägermatrix

Die Elemente werden in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) generiert und haben eine Größe zwischen 600 bp und 2,4 kb [Duggan *et al.*, 1999]. Um einen hohen Durchsatz zu erreichen, werden PCR-Produkte in Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Vertiefungen amplifiziert [Cheung *et al.*, 1999], wie in der Abbildung 2.3 gezeigt. Nach anschließender Aufreinigung werden die PCR-Produkte auf eine Trägermatrix aus Glas oder aus Nylon

übertragen [DeRisi *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1999]. Nylonmembranen besitzen zwar im Gegensatz zu Glasoberflächen eine hohe Bindungskapazität, sie weisen jedoch gegenüber Glas ein erhöhtes Hintergrundsignal auf, wenn sie mit fluoreszenzmarkierten Targets hybridisiert werden [Shalon *et al.*, 1996; Stillman *et al.*, 2000]. Glas hat gegenüber Nylon verschiedene Vorteile [Cheung *et al.*, 1999; Southern *et al.*, 1999]: 1. Die PCR-Produkte können kovalent gebunden werden. 2. Glas ist bei hohen Temperaturen oder hohen Salzkonzentrationen sehr beständig und 3. ist es nicht porös. Das Volumen der Hybridisierungslösung kann auf ein Minimum reduziert werden, wodurch die Kinetik der Hybridisierung günstig beeinflusst wird. 4. weist Glas eine geringe Eigenfluoreszenz auf und trägt somit nicht zu einem unspezifischen Hintergrundsignal bei. 5. können zwei Targets, die mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert wurden, simultan hybridisiert werden [Cheung *et al.*, 1999]. Eine unmodifizierte Glasoberfläche ist zur Immobilisierung von PCR-Produkten zumeist nicht ausreichend [Eickhoff *et al.*, 1999b]. Deshalb werden mit Poly-L-Lysin oder mit verschiedenen Silanen beschichtete Glasoberflächen eingesetzt [Eisen *et al.*, 1999], die eine höhere Hydrophobizität aufweisen [Shalon *et al.*, 1996]. Bei der Verwendung von Poly-L-Lysin Oberflächen werden die PCR-Produkte durch UV-Bestrahlung immobilisiert [Cheung *et al.*, 1999], bei silanisierten Oberflächen durch einen alkalischen pH-Wert [Guo *et al.*, 1994].

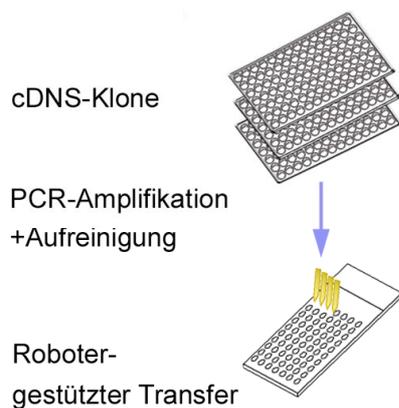


Abbildung 2.3: Amplifikation und Transfer von PCR-Produkten.

cDNS-Klone werden durch PCR in 96er Mikrotiterplatten amplifiziert. Nach der Aufreinigung durch Ethanolpräzipitation werden Aliquots von jeweils ca. 5 nl auf die Oberflächen von beschichteten Glasobjektträgern transferiert. Dadurch entstehen sog. Spots mit einem Durchmesser von ca. 250 μm , zwischen den Spots beträgt der Abstand 100 μm . Die Objektträger sind speziell beschichtet, um PCR-Produkte zu binden.

2.2.1.3 Transfer der Elemente

Die PCR-Produkte werden nach der Synthese auf die Matrix transferiert. Sie werden entweder kontaktlos oder durch Oberflächenkontakt übertragen. Bei dem kontaktlosen Verfahren werden die PCR-Produkte in Glaskapillaren aufgesogen und auf die Oberfläche geschossen. Das erfolgt in Form von 0,1 Nanoliter Tröpfchen aus einem Abstand von einem bis zwei Millimetern. Durch Kalibrierung und exakte Positionierung der Tropfen werden sehr gleichmäßige Mikroarrays erzeugt, die eine Dichte von 5.000 Klonen pro Quadratzentimeter erreichen [Soldatov *et al.*, 2001]. Bei dem Transfer durch Oberflächenkontakt wird die DNS aus den Mikrotiterplatten mit Hilfe eines hochgradig präzisen Robotersystems übertragen. Dazu wird ein Stempel mit 1 bis 16 Metallnadeln verwendet. Die Nadeln des Stempels können stumpf oder geschlitzt sein. Die gelösten PCR-Produkte aus den Mikrotiterplatten werden dabei entweder durch Adhäsion an stumpfe Nadeln oder durch Kapillarwirkung in geschlitzte Nadeln aufgenommen. Durch Kontaktschluss der Nadelspitze mit der Matrix wird, in Abhängigkeit von der Geometrie der Nadel, eine Flüssigkeitsmenge zwischen 2 und 10 Nanolitern übertragen [Cheung *et al.*, 1999]. Mit diesem Verfahren werden bis zu 1.500 Klone pro Quadratzentimeter aufgetragen [Shalon *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1998].

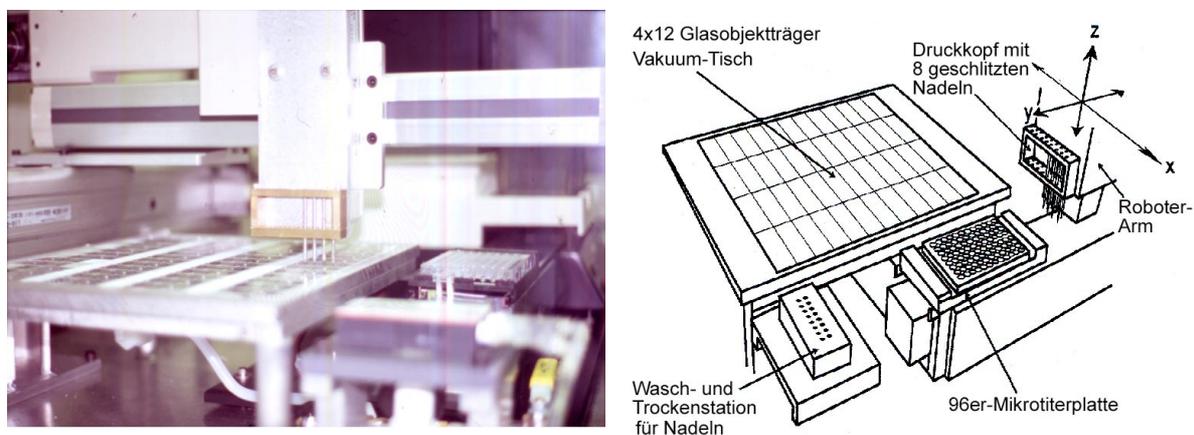


Abbildung 2.4: Roboter-System zur Herstellung von cDNS-Mikroarrays.

In einem automatisierten Durchgang führt der Computergesteuerte x-y-z-Roboterarm den Kopf mit den geschlitzten Nadeln zu den PCR-Produkten in der Mikrotiterplatte, taucht diese dort ein und wandert anschließend von einem Objektträger zum nächsten, wobei auf jedem durch Kontaktschluss 2-10 Nanoliter DNA-Lösung abgegeben werden. Im Anschluss daran werden die Nadeln in der Wasch- und Trockenstation mit Wasser gewaschen und mit angelegtem Vakuum getrocknet. Die Mikrotiterplatten werden automatisch, wenn alle Produkte transferiert sind, ausgetauscht. Links: Foto vom Beecher Arrayer; Rechts: Schematische Abbildung, modifiziert nach Khan *et al.* [1999].

2.2.2 Herstellung und Markierung der Targets

Die Gesamt-RNS aus dem zu untersuchenden Material und der entsprechenden Referenz wird aus Zellkulturen, Geweben oder Organen isoliert (Abbildung 2.5). Essenziell für eine erfolgreiche Hybridisierung ist die Qualität und die Menge der RNS. Eine qualitativ hochwertige RNS ist frei von Komponenten wie Proteinen, Kohlenhydraten oder Lipiden. Solche Verunreinigungen binden unspezifisch an die Arrayoberfläche und verursachen somit ein sehr starkes Störsignal im Hintergrund [Duggan *et al.*, 1999]. Die Menge der RNS bestimmt das Verfahren, mit dem sie markiert wird. Stehen ausreichende Mengen (50-200 µg) an Gesamt-RNS zur Verfügung, so kann ein direktes Verfahren zur Markierung gewählt werden [DeRisi *et al.*, 1997; Duggan *et al.*, 1999; Nimmakayalu *et al.*, 2000]. Wenn jedoch nur geringe Mengen (1-10 µg) verfügbar sind, sind leistungsfähigere Verfahren erforderlich, z.B. die indirekte Markierung erforderlich [Stears *et al.*, 2000]. Im Falle von sehr limitierten Ausgangsmengen (<1 µg) ist entweder eine vorgeschaltete Amplifikation vor der Markierung oder eine nachgeschaltete Amplifikation der Signale notwendig [Bobrow *et al.*, 1989; Van Gelder *et al.*, 1990; Beier *et al.*, 1999; Herrler, 2000]. Ein Nachteil der Amplifikation ist jedoch, dass die ursprünglichen Transkript-Verhältnisse der Ausgangs-RNS verzerrt werden können.

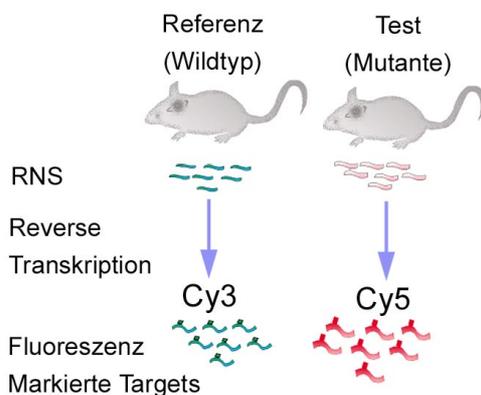


Abbildung 2.5 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Targets.

Gesamt-RNS von einer Referenz- und einer Test -Maus werden durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben und mit Cy3 (Referenz) oder mit Cy5 fluoreszent (Test) markiert. Nicht eingebaute Fluoreszenz-Moleküle werden durch Aufreinigung von den Targets abgetrennt.

2.2.2.1 Verfahren ohne Amplifikation

Bei der direkten Markierung werden Fluoreszenz-markierte Nukleotide (Cy3-, Cy5- oder FITC-dNTP) während einer reversen Transkriptionsreaktion direkt in die neusynthetisierte cDNS inkorporiert [Skena *et al.*, 1995], siehe Abbildung 2.6. Nicht-inkorporierte Nukleotide werden nach der Reaktion abgetrennt. Anstelle von Fluorochrom-modifizierten können auch Aminoallyl-modifizierte Nukleotide eingebaut werden, die eine nachfolgende Kopplung des Fluoreszenz-Farbstoffes in einer separaten Reaktion erfordern [Nimmakayalu *et al.*, 2000]

(Abbildung 2.6). Eine indirekte Markierung der cDNS unterscheidet sich methodisch von den direkten Methoden, da dabei unmodifizierte Nukleotide und ein Oligo(dT)-Primer mit einer Fangsequenz in der reversen Transkription verwendet werden, wie in der Abbildung 2.7 gezeigt. Eine spezifische Fangsequenz dient zur Anlagerung eines Dendrimer-Komplexes, der ca. 250 Fluorochrome (Cy3 oder Cy5) enthält [Stears *et al.*, 2000]. Diese Anlagerung erfolgt in einer Prähybridisierung der Targets vor der eigentlichen Hybridisierung auf den Mikroarray.

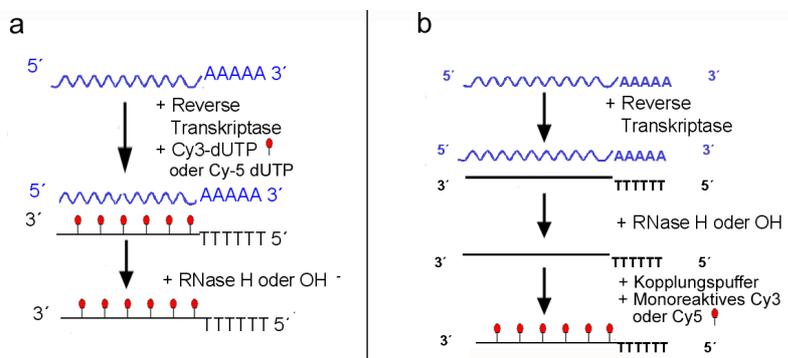


Abbildung 2.6: Direkte Fluoreszenzmarkierung der Targets.

a: Fluoreszenzmarkierte Nucleotide werden in einer reversen Transkription direkt in die cDNS eingebaut. b: Die cDNS-Synthese und die Kopplung des Farbstoffes erfolgen in separaten Reaktionen. Zunächst wird eine Aminoallyl-modifizierte cDNS hergestellt, an die dann ein monoreaktiver Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt wird.

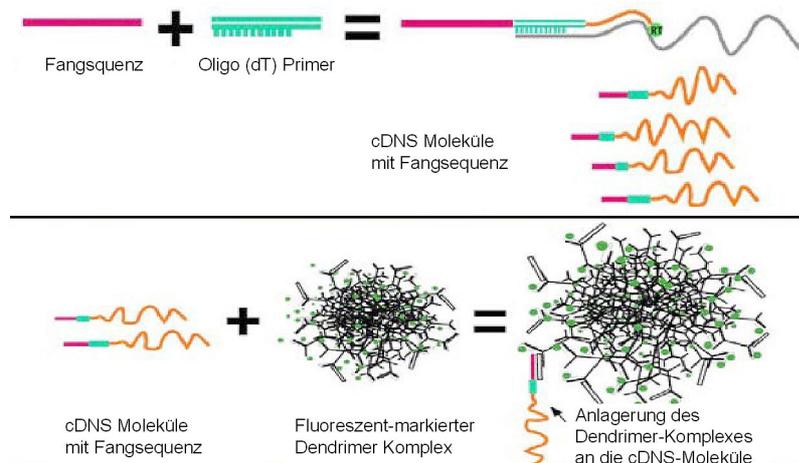


Abbildung 2.7: Indirekte Markierung der cDNS.

Oben: Für die Synthese der cDNS-Moleküle wird ein spezifischer Primer mit einer Fangsequenz verwendet.

Unten: An die Fangsequenz der cDNS wird ein Dendrimer-Komplex angelagert, der 250 Fluoreszenz-Moleküle trägt. (Joan Ferola, Genisphere).

2.2.2.2 Verfahren mit Amplifikation

Bei den Verfahren der Markierung mit Amplifikation wird zwischen RNS-Amplifikation, PCR-basierter cDNS-Amplifikation und enzymatischer Signalamplifikation unterschieden.

Zur RNS-Amplifikation wird eine *in vitro* Transkription durchgeführt (Abbildung 2.8). Ein spezifischer Primer mit einer Oligo(dT)/T7-Promotor Sequenz wird verwendet, um zunächst einen Erststrang und dann einen Zweitstrang zu synthetisieren. Aus der doppelsträngigen cDNS wird durch *in vitro* Transkription einzelsträngige cRNS linear amplifiziert [Van Gelder *et al.*, 1990; Eberwine *et al.*, 1992]. Diese cRNS wird durch direkte Markierung in fluoreszenzmarkierte cDNS umgeschrieben [Lockhart *et al.*, 1996].

Für die PCR-basierte cDNS-Amplifikation wird die SMART-Technik angewandt [Endege *et al.*, 1999; Herrler, 2000], siehe Abbildung 2.8. Zur Erststrang-Synthese wird ein modifizierter Oligo(dT)-Primer verwendet. Erreicht die reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNS, werden durch die Aktivität der Terminalen Transferase einige Cytidin-Reste angehängt. Diese dienen als verlängertes Matrizenmolekül, an das sich ein spezifisches Oligonukleotid anlagert, woraufhin die reverse Transkriptase dann die Matrize wechselt und das Oligonukleotid repliziert. Das Ergebnis dieser Reaktion ist eine einzelsträngige cDNS, die das vollständige 5'-Ende der mRNS-Matrize und die Sequenz des spezifischen Oligonukleotides enthält [Okayama *et al.*, 1982; Kato *et al.*, 1994]. Die Sequenz dieses Oligonukleotids und die des Oligo(dT)-Primers dienen als universelle Primer-Bindungsstellen für wenige Zyklen einer PCR.

Bei der Signalamplifikation (Abbildung 2.8) werden Fluoreszein- oder Biotin-modifizierte Nukleotide in einer Reversen Transkription in die neusynthetisierte cDNS inkorporiert. Nach der Hybridisierung werden diese nacheinander durch Antikörper- oder durch Streptavidin-HRP-Konjugate detektiert. Die Peroxidase (*HRP=horseraddish peroxidase*) aus den Konjugaten deponiert in der nachfolgenden Reaktion Cy3- oder Cy5-gekoppelte Tyramid-Moleküle in der räumlichen Nähe der detektierten cDNS auf der Objektträgeroberfläche [Bobrow *et al.*, 1989; Adler *et al.*, 1997].

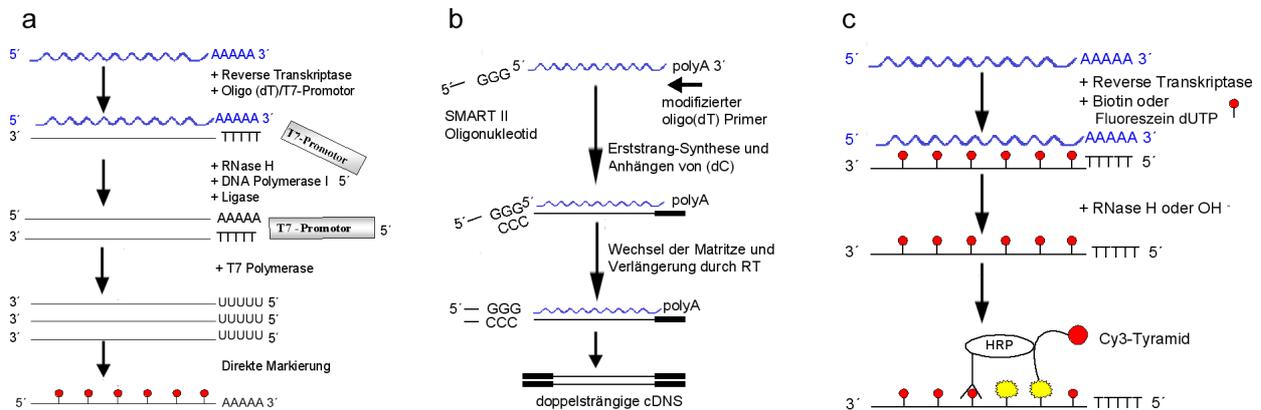


Abbildung 2.8: Markierung der Targets mit verschiedenen Methoden der Amplifikation.

a: In vitro Transkription. Der Erststrang wird durch reverse Transkription mit einem Oligo-(dT)/T7-Promotor Primer hergestellt. In der RNS werden durch Einzelstrangbrüche Primer für die Zweitstrang-Synthese gebildet. Die cDNS ist die Matrize für die cRNS Synthese.

b: SMART-Technik. Ein modifizierter Oligo(dT)-Primer wird für die Erststrang-Synthese verwendet. Am 5'-Ende der mRNS, werden durch Terminale Transferase Aktivität Cytidin-Reste angehängt. Daran lagert sich ein spezifisches Oligonukleotid an, welches anschließend als verlängerte Matrize dient. Die cDNS wird amplifiziert und separat markiert.

c: Signalamplifikation. Modifizierte Nukleotide werden durch reverse Transkription in die cDNS inkorporiert. Nach der Hybridisierung werden diese sequentiell durch HRP-Konjugate detektiert. HRP deponiert farbstoffgekoppelte Tyramid-Moleküle in der Umgebung der cDNS.

2.2.3 Hybridisierung und Waschen

Zwei unterschiedlich markierte Targets können in einer Kohybridisierung vergleichend hybridisiert werden [DeRisi *et al.*, 1997]. Die Ausbildung eines Heterohybrids ist von unterschiedlichen Einflussfaktoren abhängig: Fragmentlänge, Basenkomposition, physikochemische Umgebung (Salzkonzentration, denaturierende Agenzien, Temperatur) [Southern *et al.*, 1999]. Der Zusatz von Kompetitoren wie Poly(dA:dT), Hefe-tRNS und Cot1-DNS eliminiert unspezifische Kreuz-Hybridisierungen [Cheung *et al.*, 1999]. Cot1-DNS sättigt selektiv Wiederholungssequenzen ab, sowohl im Target als auch in den Elementen [Mathieu-Daude *et al.*, 1996]. An die Hybridisierung schließen sich mehrere Waschschrte an, um unspezifisch gebundene, nicht ausreichend komplementäre und nicht gebundene Targets von den Elementen zu trennen. Die Stringenz steigt dabei durch abnehmenden Salzgehalt in den Lösungen an. SDS in der Waschlösung destabilisiert die Heterohybride, so dass sich zwei fehlgepaarte Stränge schneller voneinander trennen. Nach dem Waschen wird das Wasser vollständig von dem Array entfernt, da ansonsten die Fluoreszenz vermindert wird.

2.2.4 Bildgewinnung und Datenanalyse

Für die Detektion wird der Objektträger in einem Laserscanner mit einer Schrittweite von 5 bis 20 μm abgetastet. Dabei wird entweder ein Laserstrahl über die Oberfläche geführt oder ein motorisierter x-y-Tisch unter einem Mikroskopobjektiv bewegt [Skena *et al.*, 1995]. Verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe müssen mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden, FITC bei 488 nm, Cy3 bei 532 nm und Cy5 bei 633 nm [Randolph *et al.*, 1997; Eisen *et al.*, 1999]. Das emittierte Fluoreszenz-Licht wird mit einem konfokalen Mikroskop, das mit entsprechenden optischen Filtern ausgerüstet ist, detektiert [Waggoner *et al.*, 1996]. Für jeden Kanal wird ein 16-Bit Bild aufgenommen, das die Helligkeitsinformationen der detektierten Signale enthält [Cheung *et al.*, 1999], siehe Abbildung 2.9. Die Helligkeitsinformationen sind von 1 bis 65536 abgestuft. Die anschließende Bildauswertung umfasst eine Spoterkennung und eine Spotanalyse [Zhou *et al.*, 2000]. Zur Spoterkennung wird ein geometrisches Raster über die Anordnung der Elemente gelegt, um das Bild zu segmentieren. Für die Spotanalyse wird durch spezifische Algorithmen ein statistischer Test durchgeführt, der aufgrund der Helligkeitsinformation eines Pixels Signal und Hintergrund diskret voneinander trennt [Chen *et al.*, 1997]. Nach der Lokalisierung eines Spots wird dessen Intensität durch Integration der einzelnen Pixelwerte berechnet und der lokale Hintergrund subtrahiert. Zusätzlich wird jedem einzelnen Segment die gesamte Klon-Information (Klon-Nummer, Gen-Name, Plattenposition, Klassifizierung) zugeordnet [Khan *et al.*, 1999]. Diese Information bildet die Grundlage für die nachfolgende Datenanalyse. Zur Visualisierung werden die Bilder virtuell überlagert und in einer Falschfarben-Darstellung ausgegeben [Duggan *et al.*, 1999], z.B. Cy3 in Grün und Cy5 in Rot, siehe Abbildung 2.9. Wenn das Referenz-Target mit Cy3 und das Test-Target mit Cy5 markiert wurde, so ist eine höhere Genexpression des Test-Targets bezogen auf die nicht veränderte Referenz in Rot dargestellt, eine verminderte in Grün. Transkripte, die gleich stark exprimiert werden, sind gelb.

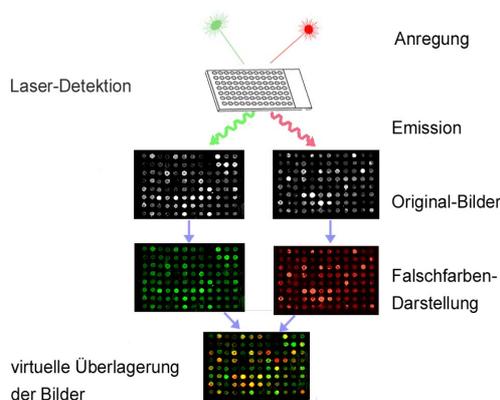


Abbildung 2.9 Bildgewinnung und Datenanalyse

In einem Laserscanner werden die fluoreszenzmarkierten, hybridisierten Targets angeregt. Zwei verschiedene Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen werden für die beiden Farbstoffe eingesetzt. Diese emittieren dann Fluoreszenz-Licht mit einer höheren Wellenlänge, das durch ein konfokales Mikroskop und einen Photomultiplier detektiert wird. Die Daten werden als monochrome Bilder aufgenommen, in eine Software importiert und nach der Bildverarbeitung als Falschfarben-Bilder dargestellt. So wird z.B. die Referenz, die mit Cy3 markiert wurde, in der Falschfarben-Darstellung und in dem virtuell überlagerten Bild in Grün dargestellt.

2.2.5 Normalisierung und Kontrollen

Die durch die Datenanalyse gewonnenen Fluoreszenz-Intensitäten müssen normalisiert werden [Tseng *et al.*, 2001]. Das dient dem Zweck, verschiedene störende Einflüsse mathematisch zu kompensieren [Khan *et al.*, 1999]. Zu diesen störenden Einflüssen zählen: Unterschiede in der Markierung, variabler Hintergrund, verschiedene Quantenausbeuten der Farbstoffe, Variabilität der Experimente [Schuchhardt *et al.*, 2000]. Um eine Normalisierungskonstante zu berechnen, wird ein Set von Haushaltsgenen oder extern zugesetzte RNS zugrunde gelegt [Chen *et al.*, 1997; Schuchhardt *et al.*, 2000]. Die Anzahl der verwendeten Haushaltsgene muss statistisch signifikant sein und basiert auf der Grundannahme, dass sie in den Test- und Referenzgewebe gleichstark exprimiert sind und einen stabilen Quotienten um 1,0 haben [Audic *et al.*, 1997; Claverie, 1999; Beissbarth *et al.*, 2000]. Aufgrund der natürlichen Varianz von Haushaltsgenen wird ein Konfidenzintervall von 99% bestimmt, um die Normalisierungskonstante zu berechnen. Diese wird dann dazu genutzt, einen kalibrierten Quotienten für jedes Element zu errechnen [Chen *et al.*, 1997].

Diese Normalisierung stellt die Grundlage für die Analyse jedes einzelnen Mikroarrays dar. Zusätzlich zu dem Set an Haushaltsgenen können exogene Kontroll-Elemente (z.B. pflanzliche Gene) zur Normalisierung genutzt werden. Hierfür setzt man vor der Markierung eine exakt definierte Menge an Pflanzen-mRNS zur Säuger-RNS zu [Schena *et al.*, 1995; Schuchhardt *et al.*, 2000]. Die markierten Transkripte der Pflanze hybridisieren an das jeweilige komplementäre Element auf dem Mikroarray und geben ein entsprechendes Signal. Anhand des Signals kann beurteilt werden, ob eine Targetpopulation eine signifikante Abweichung von 1 zeigt, wodurch zum Beispiel eine experimentelle Variation leicht zu erkennen ist [Schuchhardt *et al.*, 2000].

2.2.6 Clusteranalyse

Bei der Clusteranalyse werden gewonnene Daten verschiedener Experimente analysiert und die Profile verschiedener Gene miteinander verglichen. Die Analyse der Daten kann durch sehr unterschiedliche, speziell entwickelte Algorithmen erfolgen, z.B. durch selbstorganisierende Verfahren (*self-organizing Maps, SOMs*) [Barlow, 1995], hierarchisches Clustern [Eisen *et al.*, 1998], durch eine Kombination von Clusteranalyse und Motif-Erkennung [Tavazoie *et al.*, 1999], durch Analyse der prinzipiellen Komponenten (*principal component analysis, PCA*) [Raychaudhuri *et al.*, 2000] oder durch „selbst-lernende“ Systemanalyse (*support vector machines, SVM*) [Brown *et al.*, 2000]. So wird von jedem Datensatz ein Profil erstellt, in dem die Gen-repräsentierenden Elemente aufgrund der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters angeordnet sind. Je ähnlicher zwei Gene in ihrer

Expressionsstärke unter verschiedenen experimentellen Bedingungen sind, desto dichter beieinander sind sie in einem Cluster angeordnet [Eisen *et al.*, 1998]. Die Grundvoraussetzung ist die Annahme, dass Transkripte mit einem ähnlichen Expressionsmuster in der Zelle einen biologischen oder einen funktionellen Zusammenhang aufweisen können. So kann zum Beispiel durch einen bestimmten, vielleicht noch unbekanntem Auslöser in der Zelle eine Enzymkaskade induziert werden, wobei die veränderte Genexpression dann die Antwort widerspiegelt. Durch die Reihenfolge und Anordnung exprimierter und nicht-exprimierter Gene in einem Cluster können demzufolge bislang unbekannte funktionelle Zusammenhänge identifiziert werden.

Für die Clusteranalyse müssen normalisierte Datensätze vorliegen. Würden Daten ohne vorhergehende Normalisierung geclustert, könnten experimentelle Artefakte zusammen angeordnet werden, die keine funktionelle Relevanz besitzen. Nach der Bildanalyse und der Normalisierung wird jedem Element eine Zahl zugeordnet, die den Quotienten seiner Intensitäten repräsentiert [Chen *et al.*, 1997]. Wird ein Transkript in dem Test-Target stärker als in dem Referenz-Target exprimiert, so hat es z.B. eine Signalintensität von 50.000 (Test) gegenüber 10.000 (Referenz). Der Quotient seiner Intensitäten ist dementsprechend 5, und es kann angenommen werden, dass es sich um ein differenziell exprimiertes Transkript handelt. Um das Ergebnis zu visualisieren, wird jedem Quotienten eine Farbe zugeordnet, die direkt die Stärke der Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Targets anzeigt. Durch die Farbdarstellung in einem Cluster kann eine Veränderung in der Stärke der differentiellen Expression bei der Analyse mehrerer Experimente (z.B. Zeitreihe) sehr leicht verfolgt und identifiziert werden (Abbildung 2.10). Die Daten von mehreren Array-Experimenten werden in einer Matrix dargestellt, wobei die Gene in den Zeilen und die verschiedenen Experimente in den Spalten angeordnet sind.

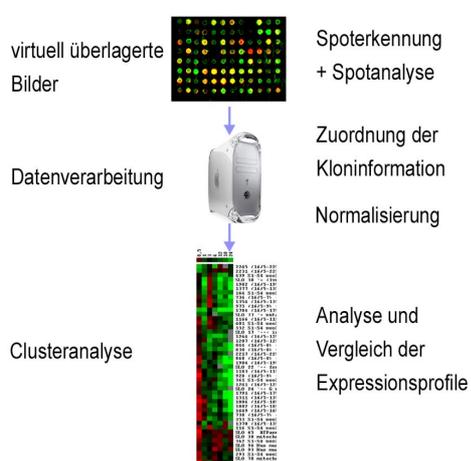


Abbildung 2.10: Datenverarbeitung und Clusteranalyse

Die Bilder werden mit einer speziellen Software analysiert, wobei mathematische Algorithmen zur Spotterkennung und zur Spotanalyse verwendet werden. Jedem Element wird bei der Datenverarbeitung die Information über den Klon, der Gen-Name, die Gen-Identifikationsnummer, Intensitätswerte sowie deren Quotient, die Normalisierungskonstante und der Konfidenzbereich der Datenanalyse zugeordnet. Die Daten von einem einzelnen Hybridisierungs-Experiment werden als normalisierte Quotienten (Cy5/Cy3) dargestellt. Signifikante Abweichungen von 1 (keine Expressionsunterschiede) zeigen eine höhere Genexpression (>1) oder eine verminderte Genexpression (<1) an. Diese Abweichungen werden jeweils auf die nicht veränderte Referenz bezogen. Die Ergebnisse von mehreren Experimenten (z.B. von einer Zeitreihe) werden anschließend durch Clusteranalyse analysiert.

2.3 Anwendungsmöglichkeiten der Mikroarray-Technologie

cDNS-Mikroarrays stellen ein wichtiges molekularbiologisches Instrument bei der komplexen Analyse der Genexpression dar. Ihren Einsatz finden Mikroarrays einerseits in der zellbiologischen Grundlagenforschung und in medizinisch relevanten Gebieten, sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapiekontrolle.

2.3.1 Zellbiologische Grundlagenforschung mit Mikroarrays

Wegweisend sind Arbeiten, in denen die Gesamtheit aller exprimierbaren Sequenzen eines Organismus auf einem Mikroarray repräsentiert sind. So wurde ein Mikroarray mit dem vollständigen Hefe-Genom zur Analyse der Diauxie eingesetzt [DeRisi *et al.*, 1997]. Für kleinere Gruppen von Genen konnte aufgrund des ähnlichen Expressionsprofils ein funktioneller Zusammenhang zwischen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und nachfolgendem transkribierbaren Genabschnitt identifiziert und bestätigt werden [DeRisi *et al.*, 1997; Brazma *et al.*, 1998; van Helden *et al.*, 1998]. Ein kompletter Hefe-Chip wurde ebenfalls zur multi-konditionellen Analyse der Sporulation [Chu *et al.*, 1998], des Zell-Zyklus [Spellman *et al.*, 1998] und der Genregulations-Mechanismen verwendet [Holstege *et al.*, 1998].

2.3.2 Verwendung von Mikroarrays zur Beantwortung medizinischer Fragestellungen

Zur Analyse des Genexpressionsprofils bedarf es nicht unbedingt des vollständigen Genoms auf dem Mikroarray. Zum Beispiel wurden von Iyer *et al.* [1999] 8600 exprimierte Gene in humanen Fibroblasten untersucht, wodurch 10 verschiedene Gen-Cluster identifiziert werden konnten. Diese haben eine wesentliche funktionelle Bedeutung bei der Signaltransduktion, der Koagulation, der Hämostase und bei Entzündungsprozessen. Eine besonders interessante Anwendung stellen Mikroarrays bei der klinischen Klassifizierung von Tumoren dar, bei denen neue Subklassen identifiziert werden konnten. So wurden in der Arbeit von Alizadeh *et al.* [2000] 96 Proben normaler und bösartiger Lymphozyten bezüglich des Expressionsmusters vom diffusen, großzelligen B-Zell Lymphom (DLBCL) charakterisiert [Eisen *et al.*, 1998]. Zwei unterschiedliche Formen des Tumors konnten identifiziert werden, die aufgrund ihres Musters einen Indikator für verschiedene Stadien der B-Zell Differenzierung darstellen.

2.3.3 Mikroarray-basierte Expressionsanalysen von Augenerkrankungen

Die Untersuchung von Augenerkrankungen mit Mikroarrays stellt eine technisch-methodische Besonderheit dar. Noch vor wenigen Jahren wären Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen von Augenkrankheiten aufgrund des geringen Ausgangsmaterials undenkbar gewesen. Durch die Entwicklung effizienter Markierungsmethoden [Yu *et al.*, 2002] und einer robusten und zuverlässigen Technologie, war es kürzlich möglich, die molekularen Prozesse der Licht-induzierten Apoptose an Mausaugen zu untersuchen [Choi *et al.*, 2001]. Die durchgeführten Experimente erlaubten einen Einblick in die Änderung der Genexpression auf Transkriptniveau, lange bevor die morphologischen Schäden an den Photorezeptoren sichtbar geworden sind [Choi *et al.*, 2001]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit stellen die Mikroarrays bei der Identifikation von Genen dar, die an der Wundheilung, nach einem refraktorischen Eingriff an der Hornhaut von Rattenaugen, beteiligt sind [Varela *et al.*, 2002]. Ebenso konnte die Genexpression von gesunden menschlichen Hornhäuten untersucht werden [Jun *et al.*, 2001]. Mit Bezug auf mögliche Therapiekonzepte, wurde durch Expressionsanalysen der Effekt einer Immunsuppression auf das Wiederauftreten einer okularen HSV-1 Infektion an Mausaugen untersucht [Higaki *et al.*, 2002].

Diese Beispiele vermitteln einen Eindruck der Anwendbarkeit und der vielfältigen Möglichkeiten der Mikroarray Technologie bei medizinisch relevanten Fragestellungen. In der vorliegenden Arbeit liegt der besondere Fokus auf der molekulargenetischen Aufklärung der Pathogenesemechanismen einer degenerativen Augenerkrankung.

2.4 Aufbau, Funktion und Erkrankung der menschlichen Netzhaut

2.4.1 Die menschliche Netzhaut

Die Netzhaut (Retina) ist die innerste Schicht des Augapfels zwischen Glaskörper und Aderhaut. Sie entsteht embryologisch aus einer Ausstülpung des Zwischenhirns und weist aufgrund einer zweischichtigen Ausgangslage eine ähnliche Schichtenbildung wie die Hirnrinde auf. Histologisch werden 10 Schichten unterschieden (Abbildung 2.11), drei von ihnen enthalten Zellkörper, die anderen enthalten Strukturen wie Dendriten und Axone. Im intakten Gewebe reagieren die Photorezeptoren auf Licht, während das Pigmentepithel der Netzhaut deren metabolische Versorgung übernimmt. Die inneren Strukturen der Netzhaut werden durch die Müller'schen Zellen versorgt. Die neuroretinalen Schichten integrieren und verarbeiten die visuelle Information. Im erkrankten Gewebe konnte durch molekulargenetische Analysen eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die an verschiedenen Formen retinaler Degeneration beteiligt sind. Dadurch kommt es zu Veränderungen in der Phototransduktionskaskade und zu Anomalien von Strukturproteinen.

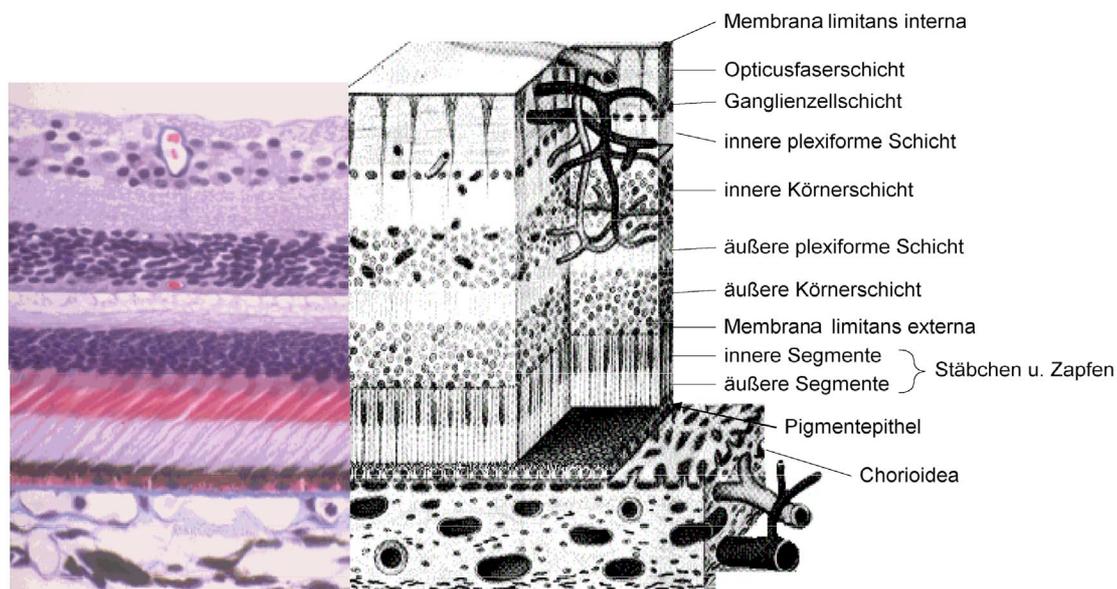


Abbildung 2.11: Aufbau der Retina, histologisch unterscheidbare Schichten.

Histologisches Schnittpräparat einer menschlichen Retina nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) und schematischer Aufbau der retinalen Schichten mit entsprechender Bezeichnung (rechts). Die äußere und auch die innere „Membrana limitans“ sind aus Bestandteilen der Müller'schen Zellen gebildet, deren Zellfortsätze quer durch alle Netzhautschichten von einer Membrana limitans zur anderen reichen und deren Kerne sich in der inneren Körnerschicht befinden. Die Membrana limitans externa, die an der Basis der Innenglieder der Photorezeptoren liegt, ist keine echte Membran, sondern eine Aneinanderreihung von interzellulären Verbindungen zwischen den Müller'schen Zellen und den Photorezeptoren. Im Gegensatz dazu ist die Membrana limitans interna eine zähe, azelluläre Membran auf der Netzhautoberfläche, die von den Müllerschen Zellen gebildet wurde und in die Fasern aus der Glaskörpermembran und aus der Glaskörperkortex reicht. Abbildung nach Rohen [2001].

2.4.2 Die Norrie Krankheit – eine degenerative Augenerkrankung

2.4.2.1 Pathogenese der Norrie Krankheit

Die Norrie Krankheit (ND) (OMIM 310600) ist eine X-chromosomal-rezessive Augenerkrankung, die durch dysplastische und proliferative Veränderungen in der Neuroretina und im Glaskörper gekennzeichnet ist [Warburg, 1961; Warburg, 1963; Warburg, 1966]. Die dysplastischen Veränderungen können zur teilweisen Ablösung der Retina vom retinalen Pigmentepithel (RPE) führen [Warburg, 1966]. Bei den proliferativen Veränderungen kommt es zur Bildung einer fibrovaskulären Masse im Glaskörper, die als Leukokorie sichtbar wird [Chynn *et al.*, 1996], Abbildung 2.12 a. Zwei hypothetische Annahmen existieren zu den bis heute nicht aufgeklärten primären Defekten: (1) Die neuroektodermale Entwicklung der Retina ist gestört, wodurch der sekundäre Glaskörper nicht gebildet wird und der primäre Glaskörper ungehindert proliferieren kann [Warburg, 1968]. (2) Die ursächliche abnormale Proliferation des Glaskörpers führt zur Fibrosierung hinter der Linse [Parsons *et al.*, 1992]. Die dadurch entstehenden Spannungen führen zur Ablösung der Retina vom RPE. Die primären Prozesse führen zu folgenden sekundären Merkmalen: Bildung retinaler Pseudotumore, Hyperplasie des retinalen Pigmentepithels, Nekrose der inneren Retinaschichten, Katarakt mit undurchsichtiger weißer Cornea und schließlich zur vollständigen Atrophie des Auges (Phtisis bulbi) [Warburg, 1966], Abbildung 2.12 b und c. Histologisch zeigt sich eine Desorganisation der nukleären Schicht der Retina und eine zahlenmäßige Verminderung der Ganglienzellen, von denen einige in die innere plexiforme Schicht wandern [Apple *et al.*, 1974; Schroeder *et al.*, 1997].

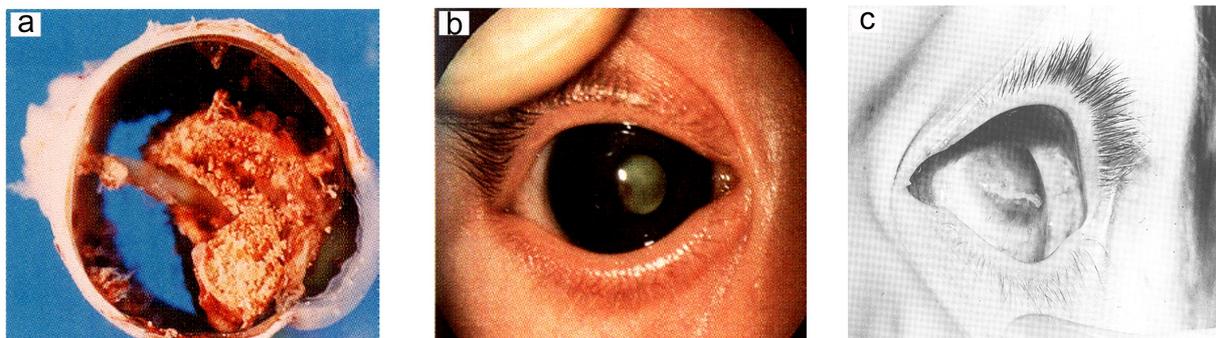


Abbildung 2.12: Proliferative Veränderungen bei der Norrie Krankheit.

a: retrolentale fibrovaskuläre Masse, b: Leukokorie, c: Phtisis bulbi; a+b [Chynn *et al.*, 1996], c [Warburg, 1966].

Diese Veränderungen führen zur Blindheit von Geburt an. Mehr als die Hälfte der Patienten ist von geistiger Behinderung betroffen und bei einem Drittel kommt es zur sensorineuralen Taubheit [Warburg, 1966]. Diese Symptome variieren sowohl in ihrer Ausprägung als auch im familiären Auftreten. Einige Patienten zeigen atypische komplexe Formen, wie eine Verkleinerung des Schädels (Mikrozephalie), gestörte Geschlechtsentwicklung (Hypogonadismus), Immundefizienz und Wachstumsstörungen [de la Chapelle *et al.*, 1985; Gal *et al.*, 1986; Donnai *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 1989].

2.4.2.2 Positionelle Klonierung des Norrie-Gens

Mittels positioneller Klonierung konnte das Gen für die Norrie Krankheit identifiziert und isoliert werden [Berger *et al.*, 1992a; Berger *et al.*, 1992b; Chen *et al.*, 1992]. Es liegt auf dem proximalen kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.4-11.3), in der Nähe des Markers DXS7 und der Gene für die A- und B-Formen der Monoaminoxidase [Gal *et al.*, 1985; Gal *et al.*, 1986; Donnai *et al.*, 1988; Sims *et al.*, 1989]. Die mRNA des Norrie-Gens hat eine Länge von 1,9 kb und beinhaltet drei Exons. Der proteinkodierende Teil überspannt das 3'-Ende von Exon 2 und einen Teil von Exon 3 mit insgesamt nur 399 bp [Berger *et al.*, 1992a]. Das Mutationsspektrum umfasst Aminosäureaustausche, vorzeitige Termination der Translation, Verschiebung des Leserahmens und Veränderungen in Splice-Erkennungs-Sequenzen [Berger *et al.*, 1992b; Isashiki *et al.*, 1995; Chynn *et al.*, 1996]. Des Weiteren wurden Punktmutationen im Norrie-Gen auch bei Patienten mit exsudativer Vitreoretinopathie (EVR) gefunden, einer Erkrankung die durch Exsudate im Glaskörper und einer gestörten Vaskularisation der peripheren Retina gekennzeichnet ist [Chen *et al.*, 1993; Shastry *et al.*, 1997a]. Auch bei Patienten mit fortgeschrittener Frühgeborenen-Retinopathie (Retinopathia praematurorum, ROP) [Shastry *et al.*, 1997b] und Morbus Coats [Black *et al.*, 1999] wurden Punktmutationen im Norrie-Gen gefunden. ROP betrifft Kinder mit geringem Geburtsgewicht, bei denen es zur Erblindung durch hypoxieausgelöste Neovaskularisationsprozesse kommt. Bei Morbus Coats treten einseitige Veränderungen der Retinagefäße auf, was zur Ablösung der Retina und damit zur Blindheit führt. Bis heute besteht keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation, insbesondere nicht für Taubheit und geistige Behinderung. Selbst innerhalb einer Familie wurden erhebliche Unterschiede im Augenphänotyp festgestellt, obwohl die Betroffenen Individuen die gleiche Mutation im Norrie-Gen aufwiesen [Zaremba *et al.*, 1998]. Eine genaue Voraussage des Krankheitsbildes aufgrund einer bekannten Mutation ist daher nicht möglich [Schuback *et al.*, 1995]. Eine Beteiligung von weiteren genetischen oder umweltabhängigen Faktoren für den Verlauf der Pathogenese ist sehr wahrscheinlich.

2.4.2.3 Zur Funktion des Norrie-Gens

Bis heute ist die Funktion des Norrie-Genproduktes (*Norrin*) ungeklärt. Am N-terminalen Ende des Norrie-Proteins befindet sich eine Signalsequenz, die eine sekretorische Funktion aufweist. Diese Funktion ermöglicht die Wanderung des Proteins in die extrazelluläre Matrix [Perez-Vilar *et al.*, 1997]. Am C-Terminus (~70 Aminosäuren) des Norrins befindet sich eine cysteinreiche Domäne, die als Cystein-Knoten-Motiv bezeichnet wird und Homologien zu zellulär-interaktiven Proteinen wie Muzinen, dem *Drosophila* Slit-Protein, dem Von-Willebrand-Faktor und Wachstumsfaktor-bindenden Proteinen zeigt [Meindl *et al.*, 1992]. Solche Domänen sind für die Dimerisierung von Proteinen erforderlich, die an spezifische Rezeptoren, wie dem Nerven-Wachstumsfaktor oder dem Abkömmling des Blutplättchen-Wachstumsfaktors binden [McDonald *et al.*, 1993]. 3D-Strukturanalysen zeigten eine strukturelle Ähnlichkeit des Norrie-Proteins zu einer Gruppe von Cystein-reichen Proteinen wie dem transformierenden Wachstumsfaktor (*TGFβ*) [Meitinger *et al.*, 1993]. Diese Befunde weisen auf eine Rolle des Norrins in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen hin [Berger *et al.*, 1996].

2.4.2.4 Die Norrie Knockout Maus

Zum Studium der Genfunktion und der Pathogenesemechanismen wurde mittels Gen-Targeting eine Norrie Knockout Mausmutante erzeugt [Berger *et al.*, 1996]. Das murine Ortholog des Norrie-Gens weist auf Proteinebene eine Homologie von 94% zur humanen Sequenz auf. Die Expression des murinen Norrie-Gens wurde durch RNA *in situ* Hybridisierung in der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht der Retina, in den Purkinjezellen des Kleinhirns, im Bulbus olfaktorius und in der sensorischen Schicht des olfaktorischen Epithels nachgewiesen [Berger *et al.*, 1996]. Die Inaktivierung des Wildtypallels in embryonalen Stammzellen der Maus erfolgte über homologe Rekombination. Der kodierende Teil von Exon 2 des Maus-Gens wurde durch einen Neomycinresistenzmarker ersetzt, wodurch die 56 N-terminalen Aminosäuren des Genprodukts fehlen [Berger *et al.*, 1996]. Ähnliche Mutationen, wie zum Beispiel Exon 2 Deletionen, sind auch bei Patienten mit Norrie Krankheit gefunden worden [Meindl *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993].

2.4.2.5 Histologie der Netzhaut von Norrie Knockout Mäusen

Die Augen von 4 bis 26 Wochen alten Mäusen wurden morphohistologisch untersucht. Besonders auffällig waren die Blutgefäße in der hinteren Augenkammer, die von fibrösem Gewebe umgeben waren [Berger *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1998]. Ebenso war in hemizygoten männlichen Tieren eine generelle Disorganisation der retinalen Ganglienzellschicht (GCL) zu erkennen (Abbildung 2.13). Einige Kerne der Ganglienzellen migrierten anscheinend in die innere plexiforme Schicht (IPL). Eine sehr ungleichmäßige Verteilung, welche die äußere nukleäre Schicht (ONL), die innere nukleäre Schicht (INL) ebenso wie die äußere plexiforme Schicht (OPL) und die Außensegmente der Photorezeptoren (OS) betreffen, waren sichtbar [Berger *et al.*, 1996]. In den fokal betroffenen Gebieten fehlten die OPL und die OS vollständig. Dort war eine Überpigmentierung des retinalen Pigmentepithels (RPE) zu erkennen. In der ND-Knockout Maus waren die Veränderungen im Glaskörper zwar vergleichsweise geringer ausgeprägt als beim Patienten, dennoch weist die Histologie der Netzhaut sehr viele Ähnlichkeiten auf. Das Blutgefäßsystem der Retina wurde ebenfalls untersucht [Richter *et al.*, 1998]. Am neunten Tag nach der Geburt führte die Inaktivierung des Norrie-Gens weder qualitativ noch quantitativ zu starken Veränderungen. Im Gegensatz dazu wurden ab dem 14. Tag vaskuläre Veränderungen in den äußeren Schichten der Neuroretina (ONL, OPL, INL und IPL) beobachtet. Dort fehlen bis auf die großen retinalen Arterien sämtliche Blutgefäße. Demgegenüber ist die Anzahl der Blutgefäße in der GCL und der Nervenfaserschicht (NFL) erhöht. In Mutanten, die älter als 20 Tage sind, tritt eine Fenestrierung der retinalen Gefäße auf [Berger *et al.*, 1996]. Elektretinografische (ERG) Untersuchungen ergaben eine veränderte Antwort auf Lichtreize in den inneren retinalen Schichten [Ruether *et al.*, 1997].

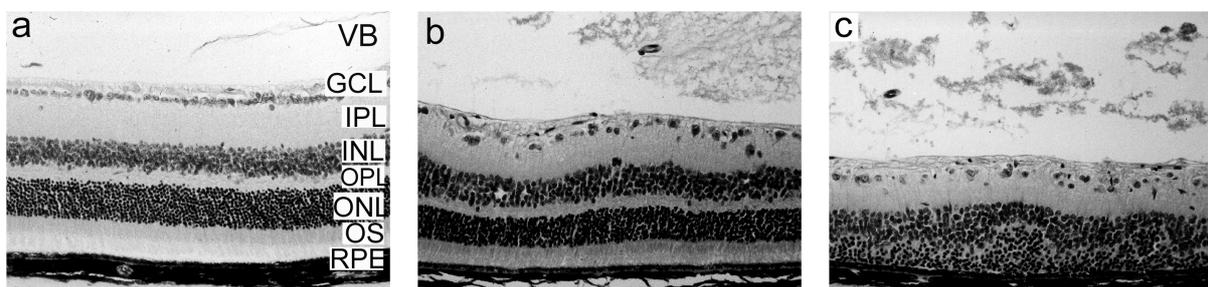


Abbildung 2.13: Morphohistologische Analyse an Augen von Wildtyp und ND-Knockout Mäusen.

a: Normaler Aufbau der retinalen Schichten einer Wildtyp Maus mit entsprechender Beschriftung; b: leicht betroffener Bereich einer 12 Wochen alten hemizygoten ND-Knockout Maus. Deutlich ist vaskularisiertes Material im Glaskörper und eine Disorganisation der Ganglienzellkerne zu erkennen. Einige scheinen in die IPL zu migrieren; c: Schwer betroffene Region der Retina einer 26 Wochen alten ND-Knockout Maus. Die äußeren Segmente der Photorezeptoren und die OPL fehlen völlig, so dass die Kerne der INL und der ONL zusammen liegen. Bezeichnungen: VB: vitreous body, GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer, OS: outer segments, RPE: retinal pigment epithelium. Abbildungen von W. Berger.

2.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die technisch-methodische Optimierung der cDNS-Mikroarray Technik als Instrument zur Genexpressionsanalyse. Durch diese Technik sollen Veränderungen im Expressionsmuster während der Krankheitsprogression der Norrie Krankheit untersucht werden. Letztendlich sollen mögliche Pathogenesemechanismen aufgeklärt werden.

Das Gesamtziel dieser Arbeit läßt sich in verschiedene Teilziele untergliedern:

- Technisch-methodische Optimierung wesentlicher Schritte zu Herstellung von cDNS-Mikroarrays (Oberflächenbeschichtung, Immobilisierung und Transfer der Elemente).
- Etablierung und Vergleich effizienter Methoden zur Markierung minimaler Mengen an Gesamt-RNS, sowie Gegenüberstellung von Verfahren mit und ohne Amplifikation.
- Entwicklung eines Verfahrens zur Charakterisierung und zum Screening von Subtraktionsbanken mit einer vergleichenden Beurteilung von Nylonblots und Mikroarrays.
- Festlegen universeller Auswertungskriterien für cDNS-Mikroarray Experimente zur Bewertung der Vertrauenswürdigkeit von differenziell detektierten Genen.
- Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren zur Detektion niedrig exprimierter Transkripte bei der differenziellen Expressionsanalyse. Gegenüberstellung und Beurteilung der einzelnen Verfahren.
- Zeitverlaufsstudie und serielle Expressionsanalyse ausgehend von minimalen Mengen an Augen-RNS von ND-Knockout Mäusen.
- Clusteranalyse zur Auswertung der erhaltenen Datensätze.