

4 METHODEN

4.1 Herstellung von cDNS-Mikroarrays

Die Herstellung der cDNS-Mikroarrays erfordert das Anlegen und die Pflege von Dauerkulturen, welche die wesentliche biologische Ressource zur Generierung von PCR-Produkten darstellen. Nachdem die entsprechenden PCR-Produkte hergestellt, aufgereinigt und resuspendiert sind, werden sie auf speziell modifizierte Oberflächen von Glasobjektträgern transferiert. Verschiedene Verfahren sind dazu im Folgenden beschrieben.

4.1.1 Anlegen von Dauerkulturen

In der cDNS-Subtraktion wurden Fragmente generiert, die beidseitig von Adaptoren flankiert waren. Diese Fragmente wurden in einen pGEMT-Easy Vektor (siehe Abbildung 3.1) ligiert, der durch Elektroporation in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen eingeschleust wurde. Die Klone wurden auf LB-Amp.-Platten, die mit 100 µl IPTG und 50 µl X-Gal überschichtet waren, ausplattiert. Nachdem sie über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, konnten erfolgreich transformierte Klone nach der blau-weiß Selektionsmethode identifiziert werden. Diese wurden in 96er U-Bodenplatten mit jeweils 100 µl LB-Amp.-Medium überführt und schüttelnd für 16 bis 24 Std. bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines sterilen 96er Pin-Replikators wurde ein identischer zweiter Ansatz angefertigt. Für die Aufbewahrung bei –80°C wurden die Kulturen 1:1 mit Glycerin überschichtet. Klone vom RZPD wurden bereits in 96er Mikrotiterplatten geliefert. Von diesen wurde ebenfalls ein Replikant angefertigt und bei –80°C aufbewahrt.

4.1.2 Generierung der Elemente

Die Klon-Inserts der Subtraktionsbanken und auch der RZPD-Klone wurden mit M13-Vektorprimern (Abbildung 3.1) in einer Kolonie-PCR amplifiziert. Mit dem 96er Pin-Replikator wurde jeweils ca. 1µl der Dauerkultur in eine 96er PCR-Platte übertragen, die PCR-Mastermix (Tabelle 4.1) enthielt. In Hinsicht auf die spätere Immobilisierung der Elemente wurden entweder NH₂-Primer oder unmodifizierte Primer verwendet. NH₂-Primer sind für die kovalente Bindung auf aktivierten Aminosilan-Objektträgern erforderlich. Für alle anderen Objektträger wurden unmodifizierte PCR-Produkte amplifiziert. Die PCR erfolgte nach folgendem Profil: 5 Min. 94°C + 30 Zyklen (45 Sek. bei 94°C, 1 Min. bei 54°C, 1 Min. bei 72°C) + 10 Min. 72°C.

Tabelle 4.1: Mastermix für eine Kolonie-PCR (96 PCR-Ansätze á 50 µl):

Komponente	Volumen [µl]
10x PCR-Puffer	500
dNTP-Mix (1 mM)	1000
M13-For (10 pmol)	200
M13-Rev (10 pmol)	200
AmpliTaq (20 U/µl)	20
H ₂ O	3000

Die cDNS-Fragmente der Subtraktionsbank werden von zwei unterschiedlichen Adaptor-Sequenzen (NpP1 und NpP2R) flankiert (Abbildung 3.1). Unter Verwendung komplementärer Primer wurde eine „Nested-PCR“ auf dem Kolonie-PCR-Produkt durchgeführt, die eine hochspezifische Amplifikation der Kloninserts erlaubt. Ohne vorhergehende Aufreinigung wurde mit dem 96er-Pin-Replikator ca. 1 µl der Amplikons aus der Kolonie-PCR in eine mit Nested-Mastermix (Tabelle 4.2) beschickte 96er PCR-Platte übertragen. Die Herstellung von Amino-modifizierten PCR-Produkten erforderte einen entsprechend angepaßten Mastermix. Es wurde wie folgt amplifiziert: 5 Min. 95°C + 25x (30 Sek. bei 95°C, 30 Sek. bei 68°C, 1 Min. 30 Sek. bei 72°C) + 10 Min. 72°C.

Tabelle 4.2: Mastermix für eine Nested-PCR (96 PCR-Ansätze á 50 µl)

Komponente	Volumen [µl]
10x PCR-Puffer	500
dNTP-Mix (4 mM)	200
NpP1 (10 µM)	100
NpP2R (10 µM)	100
AmpliTaq (20 U/µl)	25
H ₂ O	3925

Zur qualitativen Beurteilung der PCR-Produkte wurden 5 µl der Kolonie-PCR bzw. der Nested-PCR elektrophoretisch in 1,6%igen Agarosegelen aufgetrennt und durch ein Foto dokumentiert. Nicht inkorporierte Nukleotide, Primer, Enzym und Salze wurden durch Ethanolpräzipitation aus dem PCR-Ansatz entfernt. Im getrockneten Zustand wurden die Amplikons bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die Präzipitate wurden 16 bis 24 Std. vor dem Transfer in 8 µl sterilfiltriertem 3xSSC resuspendiert. Das Resuspendieren Amino-modifizierter Amplikons erfolgte in 8 µl 100 mM NaCO₃-Puffer.

4.1.3 Prozessierung der Objektträger

Elemente können kovalent oder nicht-kovalent an die Objektträger gebunden werden. Für die kovalente Bindung NH₂-modifizierter Amplikons werden silanisierte Objektträger verwendet. Diese müssen **vor dem Transfer** der PCR-Produkte aktiviert werden. Für die nicht-kovalente Bindung werden beschichtete Objektträger verwendet. Hierbei muß die bindungsfähige Oberfläche **nach dem Transfer** entweder chemisch deaktiviert oder abgesättigt werden.

4.1.3.1 Aktivierung silanisierter Objektträgeroberflächen

Die Objektträger (*InSitu-PCR Glass Slides*, Perkin Elmer) wurden in Aceton gewaschen und in einem Exsikkator unter Vakuum über Nacht getrocknet. Es folgte eine Inkubation in Aktivierungslösung für 2 Std. und zwei Waschschriffe in Methanol und in Aceton für jeweils 10 Sek. Bis zur Verwendung am nächsten Tag wurden die Objektträger in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

4.1.3.2 Deaktivierung beschichteter Objektträgeroberflächen

Nicht-modifizierte PCR-Produkte wurden nach dem Transfer durch UV-Bestrahlung bei 450 mJ auf der Oberfläche der Objektträger (*Poly-L-Lysin Slides*, Sigma) immobilisiert. Überschüssige DNS wurde durch einen kurzen Waschschriff (5 Sek. in 0,001%iger SDS-Lösung) vor der Deaktivierung entfernt. Die Lysin-Reste der beschichteten Objektträgeroberflächen wurden anschließend chemisch deaktiviert. Die Deaktivierungslösung wurde stets frisch angesetzt. Nach der zwanzigminütigen Deaktivierung wurden die Elemente denaturiert: Jeweils 2 Min. 95°C heißes MilliQ-Wasser und kalten Ethanol (96 %). Nach dem Trocknen (5 Min. bei Raumtemperatur) wurden die Objektträger unverzüglich zur Hybridisierung eingesetzt.

4.1.3.3 Absättigung beschichteter Objektträgeroberflächen

Beschichtete Objektträger (*GAPS-Coated Slides*, Corning) wurden zur Bindung von nicht-modifizierten Amplikons bei 50°C unter erhöhter Luftfeuchtigkeit für 4 Std. in einen Wärmeschrank gestellt. Um die erforderliche Luftfeuchtigkeit zu erreichen, wurden 2 Std. zuvor zwei 600 ml Bechergläser mit MilliQ-Wasser in den Wärmeschrank gestellt. Nach der Bindung wurden die Elemente bei 110°C für 15 Min. durch Hitze fixiert. Nach diesem Schritt, konnten die Mikroarrays für mehrere Monate aufbewahrt werden. Bevor sie zur Hybridisierung genutzt wurden, mußte die bindungsfähige Oberfläche in vorgewärmter Blockierungslösung (42°C, 25 Min.) abgesättigt werden. Die Lösung wurde durch einen

Waschschritt (10 Sek. in MilliQ-Wasser) entfernt. Die Objektträger wurden direkt danach denaturiert (95°C heißes MilliQ-Wasser, 2 Min.) und getrocknet (Raumtemperatur, 10 Min.). Sie mußten sofort zur Hybridisierung verwendet werden.

4.1.4 Transfer der PCR-Produkte auf Glasobjektträger

Die resuspendierten PCR-Produkte wurden durch einen hochpräzisen Roboter (Abbildung 2.4) in einem geordneten Raster auf die Oberfläche von Glasobjektträgern aufgebracht. Es wurden 1, 2 oder 4 Nadeln in linearer oder 8 in kompakter Anordnung verwendet. Das Aufnahmevermögen der geschlitzten Nadeln betrug ca. 500 nl, 2 bis 5 nl davon wurden auf die Objektträgeroberfläche transferiert. Dadurch entstanden separate, räumlich begrenzte, homogene cDNS Populationen (sog. *Spots*) mit hoher Oberflächendichte deren Durchmesser 200 bis 250 µm betrug. Nach dem Transfer wurden die Nadeln in zwei Zyklen jeweils 2 Sek. in einer Waschstation mit MilliQ-Wasser gewaschen und 5 Sek. durch Vakuum getrocknet. Roboter, Mikrotiterplatten und Objektträger befanden sich in einer abgeschlossenen Kammer, wo die Luft kontrolliert partikelfrei und feucht (70 %) gehalten wurde. Die Objektträger wurden in der Reihenfolge der Herstellung nummeriert.

4.2 Herstellung der Targets

Die zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten Targets verwendete Gesamt-RNS muß vor der Markierung hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt werden, da nur ausgehend von qualitativ hochwertiger RNS bei einem Mikroarray-Experiment gute Ergebnisse erzielt werden können. Ebenso muß eine exakte Quantifizierung der eingesetzten RNS-Mengen erfolgen, damit die experimentelle Aussage nicht durch ungleiche Ausgangsmengen beeinträchtigt wird. Der Zusatz von Pflanzen-RNS vor der Markierung ermöglicht eine interne Standardisierung und eine Einschätzung der generierten Signale. Zur Markierung können Verfahren ohne oder mit einer Amplifikation angewandt werden. Die jeweilige Methode richtet sich nach der zur Verfügung stehenden Ausgangsmenge an Gesamt-RNS.

4.2.1 Quantifizierung von Gesamt-RNS

Vor der experimentellen Verwendung wurde die Gesamt-RNS quantifiziert und qualitativ beurteilt. Dadurch wurde sichergestellt, dass exakt definierte Mengen an hochwertiger Gesamt-RNS eingesetzt wird. Ein Chip aus dem *RNA6000LabChip Kit* (Agilent Technologies) wurde gemäß der Anleitung vorbereitet. Ein Aliquot der Gesamt-RNS (1 µl)

wurde auf den Chip aufgetragen und mit einem Bioanalyzer im Vergleich zu einer RNS-Leiter analysiert. Das Ergebnis wurde durch ein Gelbild, ein Elektropherogramm und durch die exakte Angabe der RNS-Konzentration dokumentiert.

4.2.2 Zusatz von Pflanzen-mRNS

Exogene mRNS pflanzlicher Herkunft (*Spot-Report Array Validation Kit*, Stratagene) wurde zur Gesamt-RNS aus Mäuseaugen zugesetzt, sie wurde als externer Standard für die spätere qualitative und semi-quantitative Beurteilung benötigt. Exakt 1 µl der mRNS-Spike Lösung mit genau definierter Zusammensetzung an verschiedenen mRNS (100 pg cab, 10 pg rca, 1 pg rbc1) wurde zur Gesamt-RNS zugesetzt. Die mRNS-Spike Lösung wurde zeitlich kurz nacheinander, zunächst in die Knockout-RNS und dann in die Wildtyp-RNS, mit der gleichen Pipette pipettiert. Dadurch sollte die experimentelle Variation gering gehalten und eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden.

4.2.3 Verfahren der Markierung ohne Amplifikation

4.2.3.1 Verfahren der direkten Markierung

Die Synthese einzelsträngiger, direkt fluoreszenzmarkierter cDNS Zielmoleküle erfolgte während der Reversen Transkription durch verschiedene RNS-abhängige DNS-Polymerasen, (*Superscript II RNase H* und *CyScribe*). Ein alternatives Verfahren der direkten Markierung stellte die Verwendung von Aminoallylen dar. Aminoallyl-modifizierte Nukleotide wurden während der cDNS-Synthese inkorporiert. In einer nachfolgenden, separaten Reaktion wurde der Fluoreszenz-Farbstoff an die modifizierten Stellen gekoppelt.

(a) Reverse Transkription mit *Superscript II*

Die Inkorporation Fluorochrom-modifizierter Nukleotide erfolgte direkt während der Synthese des cDNS-Stranges (Abbildung 2.6). Der Reaktionsansatz (Tabelle 4.3) wurde nach fünfminütiger Denaturierung bei 65°C auf 42°C abgekühlt, mit 2 µl *Superscript II Reverse Transcriptase* (Gibco) versetzt und bei 42°C für 60 Min. inkubiert. Nach 25 Min. wurden weitere 2 µl Enzym hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 5 µl EDTA-Lösung gestoppt. Die RNS wurde durch alkalische Hydrolyse abgebaut, indem 10 µl NaOH (1 M) zugesetzt und bei 65°C für 60 Min. inkubiert wurde. Anschließend wurde mit 25 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) der pH-Wert neutralisiert und mit dem *QiaQuick-PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

Tabelle 4.3: Reverse Transkription mit Superscript II

Komponente	Volumen [μ l]
5x Erststrang-Puffer*	8
Oligo-(dT) ₁₂₋₁₈ (500 ng/ μ l)	2
Niedrig-(dT) dNTP-Mix	4
Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP (1 mM)	4
DTT	4
RNAsin	1
Gesamt-RNS (25 μ g)	17

(b) Reverse Transkription mit *CyScribe*

Damit sich die Primer-Moleküle (Tabelle 4.4) an die RNS anlagern konnten, wurden sie erst bei 70°C für 5 Min. inkubiert und danach innerhalb von 10 Min. auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz zu dem *CyScribe*-Reaktionsansatz (Tabelle 4.5) gegeben. Nach der Reaktion (42°C, 90 Min.) wurde die RNS durch Zusatz von 2 μ l NaOH (2,5 M) und 10 μ l HEPES (2 M) bei 37°C (15 Min.) hydrolysiert. Die Aufreinigung erfolgte mit *AutoSeq G-50* Säulchen (Pharmacia).

Tabelle 4.4: Ansatz für die Anlagerung der Primer an die RNS

Komponente	Volumen [μ l]
Gesamt-RNS (10 μ g)	9
geankerte Oligo(dT)-Primer	1
Nuklease-freies Wasser	1

Tabelle 4.5: *CyScribe*-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen [μ l]
5x <i>CyScribe</i> -Puffer	4
DTT	2
dUTP Nukleotid-Mix	1
Cy3-dUTP*	1
<i>CyScribe</i> reverse Transkriptase	1
Anlagerungs-Mix	11

* bzw. Cy5-dUTP

(c) Reverse Transkription mit nachfolgender Kopplung des Fluoreszenz-Farbstoffes

Unter Verwendung des *Atlas Glass Fluorescent Labeling Kits* (Clontech) wurden Aminoallyl-modifizierte Nukleotide während der Reversen Transkription in die cDNS inkorporiert. Die modifizierten Nukleotide enthalten eine reaktive primäre Aminogruppe, woran in einer separaten Reaktion reaktive freie Farbstoffe (Cy3 bzw. Cy5-monoreaktive NHS-Ester) gekoppelt werden.

Zuerst werden bei 70°C (5 Min.) Sekundärstrukturen der RNS aufgebrochen. Beim langsamen Abkühlen auf 4°C lagerten sich die Primer an die RNS an (Tabelle 4.6). Die RNS mit den Primern wurde dann zum Reaktionsansatz (Tabelle 4.7) gegeben und folgende Inkubationen wurden durchgeführt: 30 Min. bei 45°C, 5 Min. bei 70°C, 10 Min. bei 20°C. Die RNS wurde durch 0,5 µl RNaseH 15 Min. bei 37°C degradiert. Die RNase wurde anschließend durch EDTA-Lösung inaktiviert. Aufgereinigt wurde nach Zusatz von 5 µl *Quick clean resin suspension* über *0,45 µm Spin Filter* (Clontech) und zusätzlicher Ethanolpräzipitation.

Tabelle 4.6: Ansatz für die Anlagerung der Primer

Komponente	Volumen [µl]
Gesamt-RNS (10 µg)	17
Oligo(dT)-Primer (500 ng/µl)	5
deionisiertes Wasser	3

Tabelle 4.7: Reaktionsansatz für Aminoallyl-Modifikation

Komponente	Volumen [µl]
5x cDNS-Synthese-Puffer	10
10x dNTP-Mix	5
deionisiertes Wasser	7,5
MMLV reverse Transkriptase	2,5
Ansatz nach Primer-Anlagerung	25

Die nach der Ethanolpräzipitation getrockneten Aminoallyl-modifizierten cDNS wurden in 10 µl 2x Fluoreszenz-Markierungs-Puffer resuspendiert und mit 10 µl Cy3- bzw. Cy5-monoreaktiven Farbstoff in DMSO versetzt. Die Kopplung der freien, monoreaktiven Farbstoffmoleküle an die primären Aminogruppen erfolgte im Dunkeln und bei Raumtemperatur (30 Min.). Nach anschließender Ethanolpräzipitation wurden die markierten cDNS in 100 µl deionisiertem Wasser aufgenommen und zusätzlich mit dem *Atlas NucleoSpin Extraction Kit* (Clontech) aufgereinigt.

4.2.3.2 Verfahren der indirekten Markierung

Für die indirekte Fluoreszenzmarkierung wurde in einer Reversen Transkription eine cDNS synthetisiert, die an ihrem 5'-Ende eine spezifische Fangsequenz trägt. An diese wurde in einer anschließenden Reaktion ein Dendrimer-Komplex mit 250 Fluorochromen angelagert. Für die Reaktion wurde das *3DNA Submicro Expression Array Detection Kit* (Genisphere) verwendet (Abbildung 2.7).

Der Ansatz (Tabelle 4.8) wurde für 10 Min. auf 80°C erhitzt, danach auf Eis gestellt und zu dem Reaktionsansatz (Tabelle 4.9) gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 42°C. Durch Zusatz von 3,5 µl Stopp-Lösung 1 und Inkubation bei 65°C (10 Min.) wurde die RNS hydrolysiert. Mit 5 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) wurden die beiden Ansätze vor ihrer Vereinigung neutralisiert. Es folgte eine Ethanolpräzipitation, bei der Glykogen als Präzipitations-hilfe zugesetzt wurde (Tabelle 4.10). Im Kit gibt es zwei verschiedene Hybridisierungspuffer, einen Formamid-basierten und einen auf Wasserbasis. Der Formamid-basierte Puffer wurde aufgrund seiner höheren Stringenz verwendet. Nach dem Trocknen wurden die cDNS in 15 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, mit den Komponenten des Hybridisierungs-Ansatzes (Tabelle 4.11) versetzt und bei 47°C für 20 Min. vorhybridisiert.

Tabelle 4.8: Ansatz zur Anlagerung der Primer

Komponente	Volumen [µl]
Gesamt-RNS (4 µg)	5
RT-Primer	3
Nuklease-freies Wasser	2

Tabelle 4.9: Reaktionsansatz zur Erststrang-Synthese

Komponente	Volumen [µl]
5x RT-Puffer	4
dNTP-Mix	1
Nuklease-freies Wasser	4
Reverse Transkriptase	1
Ansatz nach Anlagerung der Primer	10

Tabelle 4.10: Präzipitationsansatz

Komponente	Volumen [µl]
Glykogen (aus Muscheln)	1
Ammoniumacetat	175
Ethanol, 100%	625

Tabelle 4.11: Hybridisierungs-Ansatz

Komponente	Volumen [µl]
Anti-Fade	0,5
Maus-Cot1 DNS (1µg/µl)	0,8
Cy3-Capture Reagenz	2,5
Cy5-Capture Reagenz	2,5
Oligo-(dT) Blockierungs-Reagenz	2,0
Formamid-basierter Hybridisierungspuffer	10

4.2.4 Verfahren der Markierung mit Amplifikation

Bei diesen Verfahren wird entweder die RNS oder die cDNS amplifiziert oder es erfolgt eine Amplifikation des Signals. Bei der RNS-Amplifikation werden im linearen Maßstab durch *in vitro* Transkription cRNS-Moleküle synthetisiert. Danach erfolgt eine nachgeschaltete Markierung wiederum über reverse Transkription (direkte Markierung). Die cDNS-Amplifikation basiert auf der SMART-Technik und wird durch Random Priming markiert. Ein ganz anderes Verfahren liegt der Signalamplifikation zugrunde. Hier wird eine cDNS revers transkribiert und auf den Mikroarray hybridisiert. Erst nach erfolgter Hybridisierung wird die cDNS durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion oder durch eine Streptavidin-Biotin-Reaktion detektiert. Das detektierte Signal wird durch eine enzymatische Nachweisreaktion amplifiziert.

4.2.4.1 *In vitro* Transkription

Bei der RNS-Amplifikation wird ein kombinierter Primer verwendet, der eine Oligo-(dT) und eine T7-Promotor Sequenz enthält. Durch reverse Transkription wird ein Erststrang synthetisiert. Es werden Einzelstrangbrüche in die RNS aus der cDNS:RNS-Heteroduplex eingeführt, welche zur Zweitstrang-Synthese verwendet werden. Diese nun doppelsträngige cDNS fungiert als Matrize für die anschließende *in vitro* Transkription, bei der im linearen Maßstab cRNS transkribiert wird (Abbildung 2.8). In einer anschließenden Reaktion wird diese RNS im direkten Verfahren mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Zwei verschiedene Methoden wurden angewandt: Die *in vitro* Transkription nach Eberwine und die *in vitro* Transkription in Kombination mit der SMART-Methode.

(a) *In vitro* Transkription nach Eberwine

Für die cDNS-Synthese wurde der Ansatz (Tabelle 4.12) bei 65°C (10 Min.) denaturiert, auf Eis gestellt und danach dem Reaktionsansatz (Tabelle 4.13) zugesetzt. Der folgende Temperaturzyklus wurde durchgeführt: 5 Min. bei 37°C, 5 Min. bei 45°C, 10 x (2 Min. bei 60°C und 2 Min. bei 55°C). Die Komponenten zur Zweitstrang-Synthese (Tabelle 4.14) wurden auf Eis dazu pipettiert und 2 Std. bei 16°C inkubiert. Durch Zusatz von 7,5 µl Stopp-Lösung 2 und Inkubation bei 65°C (10 Min.) wurde die Reaktion beendet. Die Aufreinigung erfolgte durch Phenol:Chloroform:Isoamyl (basisch) in Kombination mit *Phase-Lock-Gel Tubes* (Eppendorf) und durch Ethanolpräzipitation. Durch Zentrifugation in *Microcon YM-100* Säulchen (Millipore) wurde das gereinigte Produkt vor der *in vitro* Transkription aufkonzentriert. Diese wurde bei doppeltem Ansatzvolumen mit dem *T7 Megascript Kit* (Ambion) durchgeführt. Die transkribierte cRNS wurde durch Phenol:Chloroform:Isoamyl

und *Phase-Lock-Gel Tubes* gereinigt und auf eine *ChromaSpin TE+30* Säule (Clontech) gegeben. Es wurden 1,5 µg RNS direkt markiert (siehe 4.2.3). Zur qualitativen Beurteilung wurden Aliquots der Erst- und Zweitstrang-Synthese und der *in vitro* transkribierten cRNS auf einem 1,5%igen denaturierenden Formamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch ein Foto dokumentiert.

Tabelle 4.12: Anlagerungs-Mix

Komponente	Volumen [µl]
Gesamt-RNS (3 µg)	1,3
Trehalose-Stammlösung	7,7
Oligo(dT)/T7-Promotor (1 µg/µl)	1

Tabelle 4.13: Reaktionsansatz zur Erststrang-Synthese

Komponente	Volumen [µl]
Anlagerungs-Mix	10
5x Erststrang-Puffer*	4
DTT	2
RNAsin	1
dNTP-Mix (10 mM)	1
Lineares Acrylamid-Stammlösung	1
SSII reverse Transkriptase	1

Tabelle 4.14: Zweitstrang-Synthese der *in vitro* Transkription nach Eberwine

Komponente	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	106
Zweitstrang-Puffer	15
dNTP-Mix (10 mM)	3
E.coli DNS Ligase	1
E.coli DNS Polymerase	4
RNase H	1
Produkt der Erststrang-Synthese	20

(b) *In vitro* Transkription in Kombination mit SMART

Der Ansatz zur Primer-Anlagerung (Tabelle 4.15) wurde bei 70°C (10 Min.) denaturiert, auf 20°C abgekühlt und dem Reaktionsansatz (Tabelle 4.16) zugesetzt. Die Erststrang-Synthese erfolgte bei 42°C für 1 Std. Nach dem Zusatz der Komponenten für die Zweitstrang-Synthese (Tabelle 4.17) durchlief die Reaktion das folgende Temperaturprofil: 37°C für 2 Min., 94°C für 3 Min., 65°C für 3 Min., 75°C für 30 Min.. Der weitere Verlauf entspricht exakt dem nach Eberwine beschriebenen.

Tabelle 4.15 Ansatz zur Primer-Anlagerung

Komponente	Volumen [μ l]
Gesamt-RNS (1 μ g)	4,8
Nuklease-freies Wasser	4,2
Oligo(dT)/T7-Promotor (1 μ g/ μ l)	1

Tabelle 4.16: Reaktionsansatz zur Erststrang-Synthese in Kombination mit SMART

Komponente	Volumen [μ l]
Ansatz nach Primer-Anlagerung	10
5x Erststrang-Puffer	4
DTT	2
RNAsin	1
dNTP-Mix (10 mM)	2
SMART II Oligo	1
SSII reverse Transkriptase	2

Tabelle 4.17: Zweitstrang-Synthese in Kombination mit SMART

Komponente	Volumen [μ l]
Nuklease-freies Wasser	106
Advantage PCR-Puffer	15
dNTP-Mix (10 mM)	3
RNase H	1
Advantage DNS-Polymerase	3
Produkt der Erststrang-Synthese	22

4.2.4.2 Markierung von amplifizierten cDNS-Molekülen

Bei der SMART-Methode wird mRNA unter Verwendung eines spezifischen Primers durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben. Dabei werden durch einen Matrizenwechsel am 5'-Ende vollständige cDNS-Moleküle transkribiert. Die cDNS-Moleküle werden anschließend mit einer begrenzten Anzahl an PCR-Zyklen exponentiell amplifiziert. Amplifizierte cDNS-Moleküle, sowohl durch die SMART-Methode als auch durch eine konventionelle PCR hergestellte, werden entweder durch Nicktranslation oder durch Random Priming mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert.

(a) cDNS-Markierung durch Nicktranslation

Durch DNaseI-Verdau werden Einzelstrangbrüche in die cDNS eingeführt. Das den Einzelstrangbruch flankierende Ende fungiert als Substrat für die Polymerase- und die Exonukleaseaktivität vom DNS-Polymerase-Holoenzym. Durch die Polymerase-Reaktion wandert der Einzelstrangbruch in 5'->3'-Richtung, wobei Fluorochrom-modifizierte Nukleotide inkorporiert werden. Es handelt sich dabei um eine DNS-Ersatzsynthese. Die Reaktion wurde mit Hilfe des *Nicktranslation Kits* (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz (Tabelle 4.18) wurde bei 15°C für 90 Min. inkubiert und anschließend bei

65°C (10 Min.) inaktiviert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *Qiaquick PCR-Purification Kit* (Qiagen).

Tabelle 4.18: Reaktionsansatz für Nicktranslation

Komponente	Volumen [μ l]
cDNS (50 ng – 1 μ g)	12
5fach Markierungsmix	4
Nicktranslationsmix	4

(b) cDNS-Markierung durch Random Priming

Beim Random Priming werden Dekanukleotide mit zufälliger Basenabfolge eingesetzt. Dadurch ist statistisch gesehen eine Anlagerung an jeder Sequenzstelle der cDNS-Moleküle möglich. Nachdem sich die Primer an die Zielsequenz angelagert haben, wird matrizenabhängig durch das Klenow-Enzym verlängert. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut. Da die Stränge repliziert werden, erfolgt eine Netto-Neusynthese. Das Random Priming wurde mit dem *Decalabel Kit* (MBI-Fermentas) durchgeführt. Der Ansatz zur Anlagerung der Primer (Tabelle 4.19) wurde zunächst denaturiert (10 Min. 95°C, 1 Min. Eis), mit den Komponenten des Reaktionsansatzes (Tabelle 4.20) versetzt und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nachdem 4 μ l dNTP-Mix (0,25 mM) zupipettiert wurden, folgten zwei weitere Inkubationen (15 Min. bei 37°C und 20 Min. bei 65°C), anschließend wurde mit dem *Qiaquick PCR-Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

Tabelle 4.19: Ansatz zur Anlagerung der Dekanukleotide

Komponente	Volumen [μ l]
cDNS (50 ng -1 μ g)	50
Dekanukleotide in 5x Puffer	10

Tabelle 4.20: Reaktionsansatz für das Random Priming

Komponente	Volumen [μ l]
Mix B	3
Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP	1
Klenow, exo ⁻ Enzym (5U/ μ l)	1

4.2.4.3 Enzymatische Signalamplifikation

Bei der Methode, die auf dem MICROMAX TSA System (NEN) basiert, werden entweder Fluoreszein- oder Biotin-modifizierte Nukleotide in einer reversen Transkription in die cDNS inkorporiert. Nach der Hybridisierung werden diese sequentiell entweder durch Antifluoreszein-Antikörper-HRP-Konjugate oder durch Streptavidin-HRP-Konjugate

detektiert. Die Peroxidase HRP (*HRP=horseradish peroxidase*) deponiert in der nachfolgenden Reaktion entweder Cy3- oder Cy5-gekoppelte Tyramid-Moleküle auf der Objektträgeroberfläche in der räumlichen Nähe der detektierten cDNS.

Zuerst wurde die RNS mit dem Reaktionsmix (Tabelle 4.21) versetzt und bei 65°C (10 Min.) inkubiert. Danach wurde auf 25°C abgekühlt, damit sich die Primer anlagern konnten. Anschließend wurde wieder auf 42°C erwärmt, der Reaktionsansatz zugesetzt (Tabelle 4.22) und eine Stunde inkubiert. Der Zusatz von 5 µl Stopp-Lösung 2 und die Erwärmung auf 65°C für 10 Min. beendeten die Reaktion. Vor der anschließenden Aufreinigung mit *Microcon YM-100* (Millipore) wurde mit 6,5 µl Tris (1 M, pH 7,5) neutralisiert. Beide cDNS wurden vereinigt und über Nacht hybridisiert (siehe 4.3.1). Nach dem Waschen der Objektträger (siehe 4.3.2) wurden die modifizierten Moleküle sequentiell detektiert, so wie es in der Tabelle 4.23 aufgelistet ist. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Nach dem letzten Schritt wurden die Objektträger bei 500 UpM. zentrifugiert.

Tabelle 4.21: Ansatz mit Reaktionsmix

Komponente	Volumen [µl]
Gesamt-RNS (1 µg)	13
Reaktionsmix-Konzentrat	1
Fluoreszein- oder Biotin-Nukleotid	1

Tabelle 4.22: Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Komponente	Volumen [µl]
10x RT Reaktionspuffer	2,5
AMV RT/ RNase Inhibitor Mix	2

Tabelle 4.23: Inkubationen zur enzymatischen Signalamplifikation

Arbeitsschritt	Komponente	Volumen	Dauer
Inkubation ohne Bewegung	TNB-10% Goat	600 µl	10 Min.
Spülen	TNT-Puffer	30 ml	1 Min.
Inkubation ohne Bewegung	Anti-FI-HRP Konjugat Lösung	300 µl	10 Min.
3x Waschen	TNT-Puffer	30 ml	3x 1 Min.
Inkubation ohne Bewegung	Cy3-Tyramid Lösung	300 µl	10 Min.
3x Waschen	TNT-Puffer	30 ml	3x 1 Min.
Inkubation ohne Bewegung	HRP Inaktivierungs-Lösung	300 µl	10 Min.
3x Waschen	TNT-Puffer	30 ml	3x 1 Min.
Inkubation ohne Bewegung	Streptavidin-HRP Konjugat Lösung	300 µl	10 Min.
3x Waschen	TNT-Puffer	30 ml	3x 1 Min.
Inkubation ohne Bewegung	Cy5-Tyramid Lösung	300 µl	10 Min.
3x Waschen	TNT-Puffer	30 ml	3x 5 Min.
Spülen	0,06x SSC	30 ml	5 Min.

4.3 Hybridisierung und Waschen

Die Grundlage der molekularen Hybridisierung ist die Basenkomplementarität zweier Einzelstränge, die zur Ausbildung einer perfekten Duplex führt. Die cDNS-Moleküle aus dem Target müssen denaturiert werden, damit sie einzelsträngig vorliegen. Sie werden dann in der mobilen Phase mit den immobilisierten Elementen auf dem cDNS-Mikroarray gemischt und hybridisiert. Durch Waschen mit ansteigender Stringenz werden nicht ausreichend komplementäre Moleküle von den Elementen entfernt.

4.3.1 Hybridisierung

Durch die Hybridisierung soll erreicht werden, dass komplementäre Nukleinsäuren korrekt gepaart und unspezifische Bindungen unterdrückt werden. Eine effektive Hybridisierung ist von verschiedenen Einflußfaktoren wie Fragmentlänge, Basenkomposition, physikochemischer Umgebung (Salzkonzentration, denaturierende Agenzien, Temperatur) abhängig. Der Zusatz von Kompetitoren hilft bei der Unterdrückung unspezifisch hybridisierter Nukleinsäuren und der selektiven Absättigung von repetitiven Elementen. Sowohl im Target als auch in den Elementen werden durch Kompetitoren (wie z.B. Maus-Cot1 DNS, Poly(dA:dT) oder NEPR-Lösung) repetitive Sequenzen, PolyA⁺-Schwänze oder kurze komplementäre Sequenzen, die von den Insert-flankierenden Adaptoren stammen, blockiert. Eine unspezifische Hybridisierung an die Glasoberfläche wird durch Hefe t-RNS unterdrückt. Aufgereinigte und markierte cDNS-Targets wurden erforderlichenfalls in einem Vakuumkonzentrator auf ca. 5 µl eingengt, in vorgewärmter Hybridisierungslösung (37°C) resuspendiert und mit den aufgeführten Kompetitoren (Tabelle 4.24) versetzt.

Tabelle 4.24: Kompetitoren für die Hybridisierung

Komponente	Volumen [µl]
cDNS (20 ng – 25 µg)	5
Hybridisierungslösung*	30**
Maus-Cot1 DNS (1 mg/ml)	30
Poly-(dA:dT) (1 mg/ml)	5
NEPR-Lösung	1
Hefe t-RNA (5 mg/ml)	20

* (Hyb. A, B, C, D oder F)

** das Volumen der Hybridisierungslösung wird durch die Größe des Mikroarrays und des verwendeten Deckgläschens bestimmt (12x18 mm: 10 µl; 24x40 mm: 30 µl)

Der Hybridisierungs-Ansatz wurde denaturiert (3 Min. 95°C), abzentrifugiert und in die Mitte eines Deckgläschens getropft. Mit der Fläche des Glasobjektträgers, die den Mikroarray trägt, wurde dieses Deckgläschen adhäsiv aufgenommen. Der Objektträger wurde dann in eine Hybridisierungskammer (Abbildung 4.1) gelegt und am Rand mit ca. 30 µl sterilfiltriertem MilliQ-Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte für 16 bis 20 Std. bei einer Temperatur, die durch die verwendete Hybridisierungslösung bestimmt wurde (Tabelle 4.25).



Abbildung 4.1: Hybridisierungskammer.

links: Vor dem Zusammensetzen, rechts: Nach dem Zusammensetzen

Tabelle 4.25: Temperaturen der verschiedenen Hybridisierungslösungen

Hybridisierungslösungen	Temperaturen [°C]
Hyb. A	42
Hyb. B	65
Hyb. C	65
Hyb. D	55
Hyb. E	65

4.3.2 Waschen

Die Stringenz der Waschlösungen steigt durch abnehmenden Salzgehalt der Lösung von einem Waschrhythmus zum nächsten an. Durch SDS in der Waschlösung wird die Duplex destabilisiert, wodurch sich zwei fehlgepaarte Stränge schnell voneinander trennen. Die Waschlösungen wurden sterilfiltriert verwendet, wodurch Partikelchen (>0,45 µm) entfernt wurden. Die Objektträger (maximal 4 in einer Lösung) wurden mit mäßiger Bewegung in 200 ml der jeweiligen Waschlösung für 5 Min. bei Raumtemperatur gewaschen. Es wurden verschiedene Kombinationen von Waschlösungen (1+2 oder I+II) verwendet. Anschließend wurden die Objektträger entweder 10 Min. an der Luft getrocknet oder 5 Min. bei 500 UpM. zentrifugiert. Durch das Trocknen im Wärmeschrank (2 Min. bei 80°C) und Abpusten mit N₂ wurde restliches Wasser vom Mikroarray entfernt, das andernfalls das Fluoreszenz-Signal abschwächt.

4.4 Bildgewinnung und Datenanalyse

4.4.1 Bildgewinnung

Die Detektion der hybridisierten, fluoreszenzmarkierten Duplexmoleküle erfolgt sequentiell in einem Laserscanner. Der erste Durchgang wurde mit einer Auflösung von 50 μm pro Pixel durchgeführt, um die optimale Laserleistung zu ermitteln. Anhand der zugesetzten exogenen mRNA wurde die erforderliche Lasereinstellung bestimmt. Die exogene mRNA mußte in beiden Kanälen Signale mit annähernd gleicher Intensität liefern. In weiteren Durchgängen wurden bei einer Auflösung von 10 μm pro Pixel zunächst zwei bis fünf Bilder bei 635 nm (Anregung von Cy5) und danach bei 532 nm (Cy3) aufgenommen, wobei stets mit der schwächsten Laserleistung begonnen wurde. Die Bilder wurden im 16-Bit Tiff-Format gespeichert, erforderlichenfalls in ihrer Auflösung reduziert und gedreht. Zur Bildauswertung wurde eine spezielle Erweiterungssoftware für *IP-Lab Spektrum* (Scanalytics) verwendet. Zunächst wurde zur Spoterkennung und Spotanalyse ein geometrisches Raster über die Anordnung der Elemente gelegt (Abbildung 4.2), wodurch das Bild segmentiert und die Signale lokalisiert wurden. Die Signalintensitäten der Elemente wurden durch Integration der einzelnen Pixelwerte kalkuliert und der lokale Hintergrund subtrahiert. Danach wurde jedem einzelnen Element die gesamte Klon-Information (Klon-Nummer, Gen-Name, Plattenposition, Klassifizierung) zugeordnet. Zur Visualisierung wurden die Bilder virtuell überlagert und in einer Falschfarben Darstellung ausgegeben.

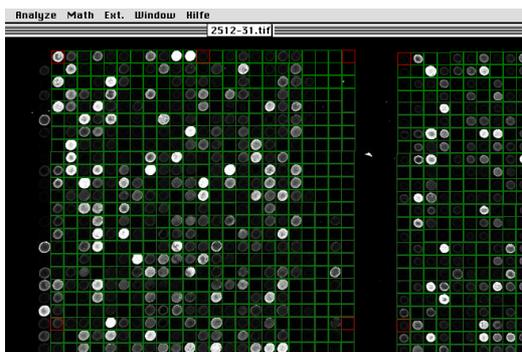


Abbildung 4.2: Geometrisches Raster zur Spoterkennung und -analyse.

Das linke Raster muß noch um einen Spot nach links verschoben werden.

4.4.2 Datenanalyse

In der Datenanalyse wurde der zunächst der Quotient der Signalintensitäten für jedes einzelne Element berechnet und in einer Häufigkeitsverteilung dargestellt (Abbildung 4.3). Dieser Verteilung wurde dann ein Konfidenzintervall von 95% oder von 99% zugeordnet, anhand dessen die verwendete Software einen oberen und einen unteren Grenzwert festlegte. Elemente, die außerhalb dieser beiden Grenzwerte lagen, konnten als vermeintlich differenziell exprimiert angesehen werden. Da diese Auswertung durch unspezifische

Hybridisierungs-Signale negativ beeinflusst werden konnte, wurden Ausschluß-Kriterien festgelegt. Diese Kriterien wurden empirisch ermittelt und lagen bei einer Signalintensität <3000 Einheiten oder einer Fläche <30 Pixel. Nach dem Einstellen dieser Werte, wurde der Datensatz normalisiert. Dazu wurde, in Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung, entweder der gesamte Datensatz oder ein Set an Haushaltsgen-repräsentierenden Elementen verwendet. Durch einen iterativen Prozess (spezieller Algorithmus der Software) wurden Parameter zur Kalibrierung der Datensätze ermittelt und auf den Quotienten angewendet.

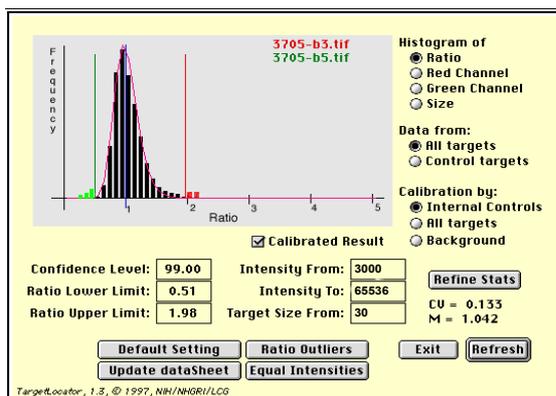


Abbildung 4.3: Häufigkeitsverteilung der Quotienten

Die Verteilung basiert auf den Signalintensitäten von jedem Element. Auf die Verteilung wird ein Konfidenzintervall von 99% angewandt, um den oberen und unteren Grenzwert zu bestimmen. Elemente außerhalb der Grenzwerte gelten als vermeintlich differenziell exprimiert. Kriterien zum Ausschluß von unspezifischen Hintergrundintensitäten sind hierbei eine Signalintensität kleiner als 3000 und eine Fläche kleiner als 30. Dieser Datensatz wurde aufgrund eines Sets an Haushaltsgenen kalibriert. Der Wert (M) für die Kalibrierung der Datensätze beträgt 1,042. Es sind die kalibrierten Quotienten dargestellt.

4.5 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse stellt eine Möglichkeit dar, Profile in der Genexpression zu identifizieren und die Datensätze verschiedener Experimente zu vergleichen. Zur Analyse wurden jeweils die kalibrierten Quotienten der jeweiligen Experimente verwendet, wobei diejenigen von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden, die unter die Ausschlußkriterien fielen (4.4.2). Der erste Schritt bestand darin, die Datensätze in die Software *Cluster* (M. Eisen, Stanford) zu importieren. Dort wurde der Datensatz zunächst gefiltert, so dass für mindestens 80% der Elemente ein Wert vorhanden war. Ein Quotient mit einem kleinen Wert (z.B. 0,5) entspricht einer zweifachen differenziellen Expression genauso wie 2,0 – nur in der entgegengesetzten Orientierung. Um diese Unterschiede zahlenmäßig besser darzustellen, mußten die Werte transformiert werden. Sie wurden durch ihren binären Logarithmus ersetzt, sodass aus 0,5 (-2) wurde. Der nächste Schritt bestand darin, die Daten hierarchisch zu clustern. Die Grundidee bei diesem Clusterverfahren besteht darin, die Gene in einer Art Baumstruktur anzuordnen. Gene, die einander sehr ähnlich sind, werden dabei durch kurze Äste verbunden; wohingegen mit zunehmender Länge der Äste ihre Ähnlichkeit abnimmt. Die transformierten Daten und die Information über die metrische Ähnlichkeit der einzelnen Gene wurde durch das Programm *TreeView* (M. Eisen, Stanford) visualisiert. Da dieses Programm das Ergebnis nur in Form einer rot-grün-schwarzen Matrix ausgibt, wurden die transformierten Werte mit Excel in eine Falschfarben-Darstellung umgewandelt.