

5 ERGEBNISSE

Mit Hinsicht auf die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, war zunächst die technisch-methodische Entwicklung und Optimierung einzelner Verfahrensschritte der Mikroarray-Technik erforderlich. Die entwickelten cDNS-Mikroarrays sollten als ein neues Instrument der Genexpressionsanalyse Verwendung finden, wodurch ein veränderter transkriptioneller Zustand eines Gewebes im Vergleich zu einer Referenz erfasst werden kann. Die biologisch-medizinische Fragestellung war auf die Aufklärung der Pathogenesemechanismen einer degenerativen Augenerkrankung ausgerichtet. Wobei durch die Analyse des Expressionsmusters letztendlich ein Einblick in die Krankheitsprogression erhalten werden sollte.

5.1 Optimierung wesentlicher Schritte der cDNS-Mikroarray Technologie

Die Methodenentwicklung und die technische Optimierung war strikt auf die Fragestellung und das verfügbare, limitierte biologische Material – RNS aus Mausaugen – ausgerichtet. Die Grundlage für diese Arbeit war eine augenspezifische cDNS-Subtraktionsbank. Aufgrund der Orientierung von Tester- und Treiber-RNS war diese cDNS-Bank insbesondere für gering exprimierte Gene angereichert, die in den Augen von Norrie-Knockout Mäusen fehlen oder auf einem sehr geringen Niveau exprimiert sind (siehe hierzu auch Abschnitt 5.2.1). PCR-Produkte aus dieser Bank stellten in Kombination mit fluoreszenzmarkierten cDNS-Targets, die ebenfalls aus dieser Subtraktionsbank stammten, ein besonders gutes Modellsystem für Optimierungsexperimente dar.

Zu den wesentlichen Grundvoraussetzungen der cDNS-Mikroarray Technologie gehört die Oberflächenmodifikation der verwendeten Glas-Trägermatrix, eine effiziente Fluoreszenzmarkierung der Targets und optimale Hybridisierungsbedingungen. Da die erzielten Hybridisierungsergebnisse von sehr vielen Parametern beeinflusst werden, ist ein geeignetes Set an Kontrollen und eine entsprechende Normalisierungs-Strategie notwendig. Nach der reinen Techniketablierung folgt in einem späteren Abschnitt die Optimierung für Expressionsanalysen mit limitiertem Augenmaterial (5.4).

5.1.1 Vergleich verschiedener Oberflächenmodifikationen

Die Modifikation der Objektträgeroberfläche hat einen wesentlichen Einfluß auf die Bindung der PCR-Produkte (Elemente), die Form der Spots und auf die Zugänglichkeit der immobilisierten Nukleinsäuren in einer Hybridisierung. Glasobjektträger mit drei unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen wurden verglichen: Poly-Lysin, aktiviertes Silan und Aminopropyl-Silan. Für diesen Vergleich wurden PCR-Produkte von 96 cDNS-Klonen einer cDNS-Subtraktionsbank (16/5-SSH) in einer Nested-PCR amplifiziert und auf die jeweiligen Objektträger übertragen. Auf diese Elemente wurden zunächst fluoreszent markierte Einzelklone und später komplexere Targets (Subtraktionsprodukte) hybridisiert. Die Poly-Lysin-Beschichtung der Objektträger (*Poly-Lysin Slides*, Sigma) war häufig sehr unregelmäßig, wodurch die Elemente lokal unterschiedlich stark an die Oberfläche gebunden wurden. Im Vergleich zu den beiden anderen Modifikationen war die Bindung insgesamt gering, was beim ersten Kontakt mit der Deaktivierungslösung zu einem starken Verschmieren von nicht immobilisierten PCR-Produkten und einer äußerst unregelmäßigen Form der Spots führte (Abbildung 5.1 a). Durch einen vorgeschalteten Waschschriff mit SDS (0,001%) konnte diese überschüssige cDNS entfernt werden (Abbildung 5.1 b). Dadurch wurde jedoch die Oberflächendichte der Elemente verringert, was zu niedrigeren Signalintensitäten führte.

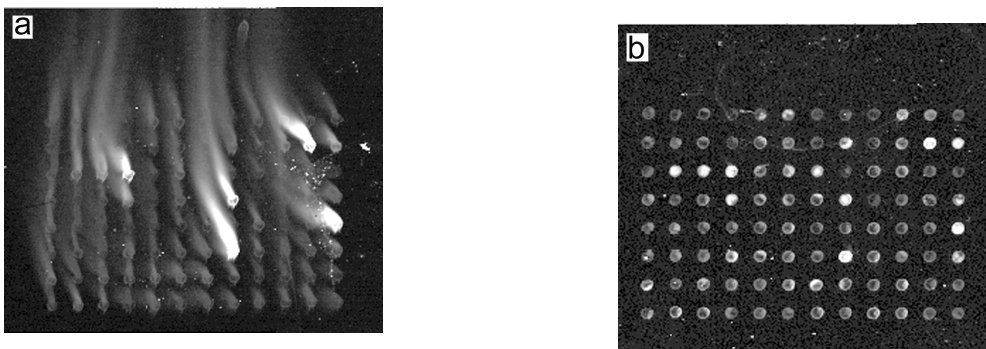


Abbildung 5.1: Poly-Lysin-beschichtete Objektträger mit 96 Elementen.

Auf dem Mikroarray sind 96 Elemente der einer cDNS-Subtraktionsbank (16/5-SSH) nach Hybridisierung eines fluoreszenzmarkierten cDNS-Targets (Subtraktions-Produkt 16/5). a: Verschmieren der cDNS beim ersten Kontakt mit der Deaktivierungslösung; b: Überschüssige cDNS der Elemente konnte durch einen vorgeschalteten Waschschriff entfernt werden.

Silanisierte Objektträger (*InSitu-PCR Glass Slides*, Perkin Elmer) binden nach chemischer Aktivierung Amino-modifizierte Nukleinsäuren kovalent und besitzen keine Bindungsfähigkeit für unmodifizierte Nukleinsäuren. Durch die kovalente Immobilisierung konnte eine hohe Oberflächendichte der Elemente erreicht werden, die jedoch nicht homogen war. Durch Randeffekte kam es nach dem Transfer zu ungleichmäßig starkem Trocknen der Elemente, sodass sich ringförmige, zum äußeren Rand verstärkte Konzentrationsgradienten bildeten

(Abbildung 5.2). Die Elemente sind mit dem 5'-Ende an die Oberfläche gekoppelt und ragen mit dem 3'-Ende in den Hybridisierungsraum, dadurch sind sie in einer Hybridisierung frei zugänglich.

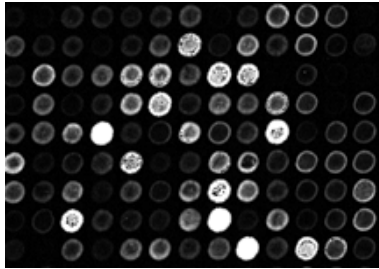


Abbildung 5.2: Randeffekte.

Durch ungleichmäßiges, am Rand des Elementes verstärktes Trocknen kommt es zu sog. „Donuts“.

Objektträger, die mit Aminopropyl-Silan beschichtet waren (*GAPS-Coated Slides*, Corning) zeigten eine sehr hohe Bindungsfähigkeit für cDNS im Vergleich zu den anderen Methoden, siehe Abbildung 5.3. Die Form der Spots war sehr homogen, da die übertragene cDNS-Lösung aufgrund der hydrophoben Oberflächenbeschichtung halbkugelförmige Tröpfchen bildet, die sehr gleichmäßig trockneten. Die detektierten Signale zeigen, dass die Elemente in einer Hybridisierung frei zugänglich sind (Abbildung 5.3).

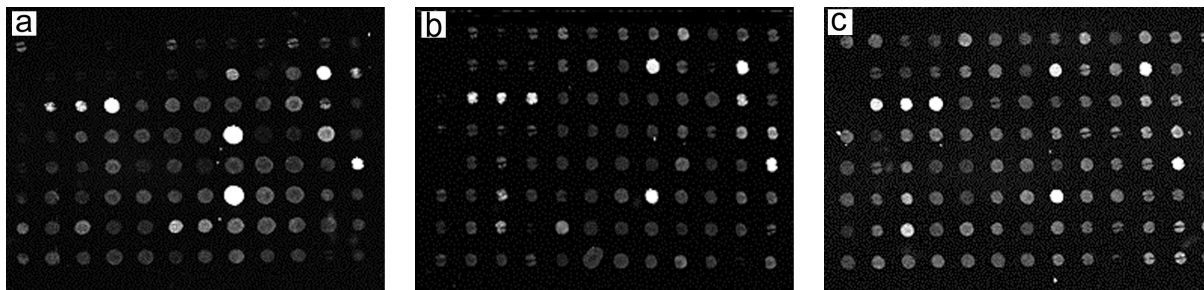


Abbildung 5.3: Vergleich unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen.

cDNS-Mikroarray mit 96 Elementen, die durch PCR anhand der cDNS-Subtraktionsbank (16/5-SSH) amplifiziert und auf die verschiedenen Objektträger übertragen wurden. Gezeigt ist das Ergebnis nach Hybridisierung eines fluoreszent markierten Targets (Subtraktionsprodukt der 16/5-SSH). **a:** Beschichtung mit Poly-Lysin; **b:** Aktivierte Silan-Beschichtung; **c:** Aminopropyl-Silan-Beschichtung.

5.1.2 Vergleich verschiedener Hybridisierungslösungen

Neben der Oberflächenmodifikation hat die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung, deren Temperatur und der Zusatz von Kompetitoren einen wesentlichen Einfluß auf eine effiziente Hybridisierung. Um optimale physiko-chemische Bedingungen zu ermitteln, wurden fünf verschiedene Hybridisierungslösungen bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen. Der experimentelle Ansatz entsprach dem unter 5.1.1 beschriebenen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.4 dargestellt, sie wurden anhand des Verhältnis von Signal zum Hintergrund („*signal-to-noise ratio*“) und der Spezifität der detektierten Signale beurteilt. Das höchste Signal/Hintergrund-Verhältnis und die höchste Spezifität zeigte eine Formamid-basierte Lösung (Hyb. A) bei 42°C, Abbildung 5.4a. Bei einer Lösung (Hyb. C) wurde durch Komponenten der Hybridisierungslösung (SDS, PEG) ein unspezifischer Hintergrund verursacht (Abbildung 5.4c).

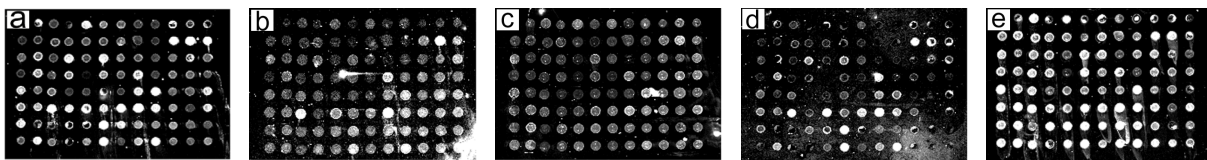


Abbildung 5.4: Einfluß verschiedener Hybridisierungslösungen und Temperaturen auf die Hybridisierung.

Hybridisiert wurde ein komplexes Target (16/5-SSH) auf Elemente der selben Subtraktionsbank. a: Hyb. A; b: Hyb. B; c: Hyb. C; d: Hyb. D; e: Hyb. E.

Durch Zusatz von Kompetitoren, wie NEPR-Lösung, Maus-Cot1 DNS, oder Poly(dA), konnten Kreuz-Hybridisierungen vermindert, jedoch nicht völlig unterdrückt werden. In der NEPR-Lösung sind diejenigen Sequenzen enthalten, mit denen sowohl die Klon-Inserts der Subtraktionsbank amplifiziert wurden (Elemente), als auch das Subtraktionsprodukt selbst (Target). Es konnte gezeigt werden, dass dieser kurze, komplementäre Bereich von 22 bp ausreicht, um ein signifikant über dem Hintergrund liegendes Signal zu erzeugen. Durch Zusatz von NEPR-Lösung zur Hybridisierungslösung wurde die Spezifität erhöht. Durch Cot1-DNS und Poly(dA) konnten Signale, die durch repetitive oder Poly(A)-Sequenzen verursacht wurden, effektiv vermindert werden. Falls es in einem Experiment zu einer unzureichenden Absättigung solcher Sequenzen kam, so wurde das durch entsprechende komplementäre Elemente, die auf jedem Mikroarray als Kontrollen enthalten waren, angezeigt.

5.1.3 Das Set der Kontrollen

Um Unterschiede in der Markierungseffizienz auszugleichen und ein Mikroarray-Experiment qualitativ zu beurteilen, wurde ein umfangreiches Set an verschiedenen Kontrollen entwickelt. Die inkorporierten Fluoreszenz-Farbstoffe unterscheiden sich durch unterschiedliche Quantenausbeuten in ihrer Anregung und Emission und weisen eine sehr unterschiedliche Photostabilität und Einbauraten auf. Um diese Einflüsse bei der Detektion zu kompensieren, wurden vor jedem Experiment zu jeder Gesamt-RNS exakt quantifizierte Mengen (von 1 bis 100 pg) von drei unterschiedlichen Pflanzen-mRNS zugesetzt („*gespikt*“). Diese exogene mRNS war ein unabhängiger, externer Standard, der alle Verfahrensschritte durchlief und durch jeweils 12 räumlich verteilte, komplementäre Elemente detektiert wurde. Zusätzlich bot dieser Standard die Möglichkeit einer halbquantitativen Bestimmung der relativen Transkript-Häufigkeit. Das Ergebnis eines Hybridisierungs-Experimentes, bei dem exogene mRNS zugesetzt wurde, ist in Abbildung 5.5 gezeigt. Als weitere Kontrollen wurden 3x SSC, Klone ohne Insert, poly(dA) und Cot1-DNS verwendet. Die vielfältigen Kontrollmöglichkeiten und die dadurch mögliche Beurteilung des Hybridisierungsexperimentes ist in der Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Set von Kontrollen zur Beurteilung des Experimentes

	exogene mRNS	exogene cDNS	poly(dA) ₄₀₋₆₀	Lachssperma-DNS	Maus-Cot1 DNS	3xSSC	Luft
Verschleppung der cDNS beim Transfer						+	+
Orientierung des Arrays	+	+					
Beurteilung der Hybridisierungs-Konsistenz	+	+					
Optimierung der Scannereinstellung	+	+					
Normalisierung der Unterschiede in der Einbauraten und in der Quantenausbeute	+	+					
Quantifizierung der Farbstoffverhältnisse	+	+					
Bestimmung der Signallinearität und Sensitivität	+	+					
Bestimmung der Hybridisierungsspezifität		+	+	+	+	+	+
Positive Hybridisierungskontrolle	+	+					
Negative Hybridisierungskontrolle		+		+	+		
Bestimmung der RNS-Qualität	+	+					

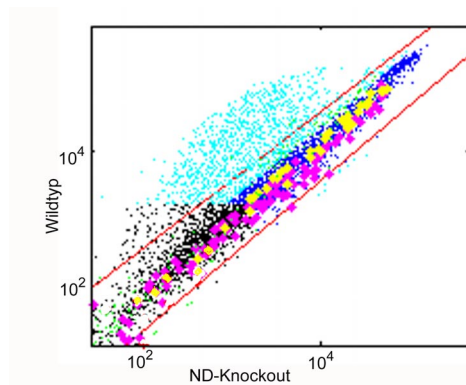


Abbildung 5.5: X-y-Diagramm eines Datensatzes mit farblich unterschiedenen Kontrollen.

Der gewonnene Datensatz wurde durch Hybridisierung SMART-amplifizierter Targets einer 24 Monate alten ND-Knockout und Wildtyp Maus gewonnen. Die Normalisierung wurde anhand der Haushaltsgene (pink) durchgeführt. Folgender Farbcode wurde angewandt: gelb: spike-mRNS, grün: negativ Kontrollen (leeres Element, 3xSSC, poly(dA), Cot1-DNS), blau: Elemente mit einer Signalintensität >3000, Spot-Fläche>30, hellblau: potenziell differenziell exprimierte Transkripte nach Auswertung und Normalisierung, schwarz: Hintergrundsignale (Signalintensität<3000, Spot-Fläche<30, rote Linien: Grenzen der 2fachen differentiellen Expression.

5.1.4 Die Normalisierung

Ein Datensatz kann über drei verschiedene Verfahren normalisiert werden: Anhand von Haushaltsgenen, über alle Elemente oder durch ein Subset an gleich exprimierten Elementen.

5.1.4.1 Haushaltsgene

Für die Verwendung von Haushaltsgenen zur Normalisierung konnten folgende Grundvoraussetzungen festgelegt werden:

- (i) Die Anzahl der Elemente muß statistisch signifikant sein (mind. 30 verschiedene Gene, jeweils durch drei bis fünf verschiedene Elemente repräsentiert).
- (ii) Die Verteilung der Signalintensitäts-Quotienten muß symmetrisch sein und ein Maximum bei 1 ($\pm 0,2$) haben.
- (iii) Die Signalintensitäten müssen einen Bereich von zwei Dekaden überspannen.
- (iv) Die kalkulierte Normalisierungskonstante M muß zwischen 0,9 und 1,1 liegen¹.

Ein Beispiel eines Datensatzes, der mit der entwickelten Strategie normalisiert wurde, ist in der Abbildung 5.6 gezeigt. Dort zeigen sehr viele Transkripte eine differenzielle Expression, sie fehlen in der ND-Knockout Maus oder sind im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimiert. Diese Transkripte zeigen einen Signalintensitäts-Quotienten, der kleiner als 0,5 ist (grüner Balken). Unabhängig von dieser zweigipfligen, schiefen Verteilung zeigen die Haushaltsgene eine steile, fast symmetrische Verteilung, mit einem Maximum bei 1. Da die Normalisierung durch unspezifische Hybridisierungs-Ereignisse oder durch störende Hintergrundfluoreszenz beeinträchtigt werden konnte, wurden Ausschluß-Kriterien festgelegt. So wurden systematisch Singale mit einer geringen Intensität (<3000) und einer sehr kleinen Spot-Fläche (<30 Pixel) für die Berechnung der Normalisierungskonstanten ausgeschlossen (schwarze Punkte in der Abbildung 5.5).

¹ Diese Normalisierungskonstante wurde durch einen speziellen Auswerte-Algorithmus [Chen *et al.*, 1997] der Software (IP-Lab-Spectrum 3.2, *Scanalytics*) errechnet und ist daher System-spezifisch.

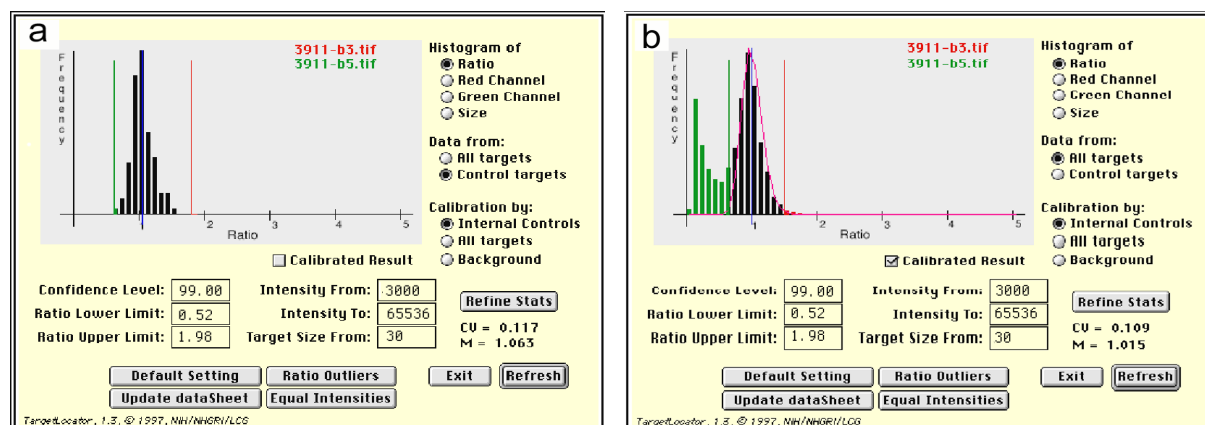


Abbildung 5.6: Häufigkeitsverteilungen der Signalintensitäts-Quotienten.

Datensatz einer Hybridisierung mit SMART-amplifizierten cDNS-Targets, die anhand von Augen-RNS einer 24 Monate alten ND-Knockout und Wildtyp Maus hergestellt wurden. **a:** Häufigkeitsverteilung von 31 verschiedenen Haushaltsgenen, die durch 111 Elemente repräsentiert sind (viele Balken liegen übereinander). Die Quotienten der Signalintensitäten sind symmetrisch verteilt und haben ein Maximum bei 1. Bei der Kalkulation der Normalisierungskonstanten wurden Elemente ausgeschlossen, die unterhalb der festgelegten Kriterien lagen (Signalintensität < 3000; Fläche < 30). **b:** Häufigkeitsverteilung nach der Kalibrierung mit der Normalisierungskonstanten ($M = 1,015$)

5.1.4.2 Gesamtheit aller Elemente

Eine Normalisierung, basierend auf der Grundgesamtheit aller Elemente konnte nur dann erfolgreich angewandt werden, wenn nur sehr wenige Transkripte differenziell exprimiert sind und eine Vielzahl auf gleichem Niveau exprimiert sind. Diese Art der Normalisierung wurde häufig bei Experimenten zur Markierungseffizienz angewandt, bei der RNS aus einer Quelle eingesetzt wurde, siehe 5.4.1. Der erste Schritt bestand auch hier in der Beurteilung der Häufigkeitsverteilung nach den oben genannten Kriterien, wonach dann die entsprechende Funktion der Software zur Kalibrierung angewählt wurde.

5.1.4.3 Konstant exprimiertes Subset

Ein angereichertes Target, wie zum Beispiel ein Subtraktionsprodukt, konnte weder basierend auf den Haushaltsgenen noch auf der Grundgesamtheit aller Elemente normalisiert werden. Die Haushaltsgene wurden während der Subtraktion aufgrund ihrer gleichen Expressionsstärke reduziert und die Gesamtheit der Elemente zeigte aufgrund der Anreicherung für differenziell exprimierte Transkripte eine zweipikige Verteilung. Somit konnte die Normalisierung nur anhand eines Subsets (31 verschiedene Gene durch 111 Elemente repräsentiert) erfolgen, von dem bestätigt war, dass die darin enthaltenen Transkripte keiner Regulierung unterliegen. Das waren im Falle der Subtraktionsprodukte mitochondriale Gene, die aufgrund ihrer starken Expression während der SSH nicht stöchiometrisch abgereichert wurden.

5.2 Vergleich von Nylon-Arrays mit Glas-Mikroarrays

5.2.1 Analyse der Vorwärts-Subtraktionsbank

Zum Vergleich der soweit optimierten Technik der cDNS-Mikroarrays mit der klassischen Technik der Nylon-Arrays, wurden in einem Pilot-Experiment 96 Klone analysiert. Um differenziell exprimierte Gene in den Augen von ND-Knockout Mäusen zu identifizieren und zu isolieren, wurde durch subtraktiv-suppressive Hybridisierung (SSH) eine Augen-spezifische Subtraktionsbank hergestellt. Diese ist für Gentranskripte angereichert, die in einer Population von mRNS (Tester) vorhanden sind und in einer anderen (Treiber) fehlen. Gleichzeitig wurden in Tester und Treiber gleich stark exprimierte Sequenzen reduziert. Für die Subtraktion wurde Gesamt-RNS aus den Augen einer 2 Jahre alten ND-Knockout Maus und eines gleichaltrigen Wildtyp Tieres verwendet, um Tester- und Treiber-cDNS zu generieren. Die Orientierung der Vorwärts-Subtraktion (16/5-SSH) sollte zur Anreicherung von cDNS-Fragmenten führen, die in den Augen von ND-Knockout Mäusen fehlen oder eine geringere Abundanz im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Jedoch kann eine solche Subtraktionsbank ebenfalls cDNS-Klone enthalten, die zu Transkripten aus beiden mRNS-Populationen korrespondieren (Hintergrund der Subtraktion). In einem differenziellen Präscreening sollten diejenigen Klone identifiziert werden, die differenziell exprimierte Transkripte repräsentieren. Dazu wurden 96 zufällig aus dieser Subtraktionsbank ausgewählte Klone sowohl auf einer Nylon-Membran als auch auf einem Glasobjektträger angeordnet.

(a) Nylonmembran

PCR-amplifizierte Inserts wurden nach der Aufreinigung mit Hilfe eines 96er Pin-Replikators auf eine Nylon-Membran übertragen. Für die Hybridisierung wurden die Produkte aus der Vorwärts- (16/5-SSH; Tester: Wildtyp) und der Reversen-Subtraktion (5/16-SSH; Tester: ND-Knockout) radioaktiv markiert und auf zwei identische Membranen hybridisiert. Die Signale wurden autoradiographisch detektiert und mit IP-Lab quantifiziert (Abbildung 5.7).

(b) Glasobjektträger

Nach der Aufreinigung wurden die PCR-amplifizierten Inserts durch den Roboter auf Poly-Lysin modifizierte Glasobjektträger übertragen. Die Produkte der SSH wurden folgendermaßen markiert: Produkt der Vorwärts-Subtraktion (16/5-SSH) mit Cy3 und das Produkt der Reversen-Subtraktion (5/16-SSH) mit Cy5. Sie wurden auf zwei identische Mikroarrays hybridisiert. Die Signale wurden mit dem Laserscanner detektiert und mit IP-Lab quantifiziert (Abbildung 5.8).

Nach der Bildgewinnung und Datenanalyse wurden beide Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit verglichen, differenziell exprimierte Klone zu detektieren. Dabei gab der Quotient der Signalintensitäten der beiden hybridisierten Subtraktionsprodukte Auskunft über die Stärke der differenziellen Expression eines Transkripts. Diese Quotienten wurden entsprechend ihrer Rangfolge angeordnet, sodass Elemente, die ein stark differenziell exprimiertes Transkript repräsentieren an erster Stelle stehen (siehe Abbildung 5.7. und Abbildung 5.8). Um die differenzielle Expression mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen und zu bewerten, wurden die Inserts der 96 Klone auf Virtuelle Northern Blots² (VNB) hybridisiert. Somit waren für jeden einzelnen Klon Aussagen über seine Expressionsstärke möglich. Diese wurden in Form eines Farbcodes zur Beurteilung der beiden verglichenen Methoden (Nylon-Arrays und Glas-Mikroarrays) verwendet. Darin wird durch Grün eine stark differenzielle Expression, bzw. ein Fehlen des entsprechenden Transkripts im ND-Knockout angezeigt; Hellgrün zeigt eine schwache Expression im ND-Knockout im Vergleich zum Wildtyp.

Durch Rot ist der Hintergrund der Subtraktion gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um Fragmente, die vermeintlich im Norrie-Knockout stärker vorhanden sind als im Wildtyp, obwohl die Orientierung der Vorwärts-Subtraktion solche nicht anreichert. Durch die Rangordnung der Klone und den Farbcode konnte ein Grenzwert (*Cut-off*) definiert werden. Dieser Grenzwert dient der Unterscheidung zwischen verifiziert differenziell exprimierten und solchen, die nicht verifiziert werden konnten. Der Grenzwert wurde auf einen Signalintensitäts-Quotienten von 2,0 festgelegt. Das bedeutet, dass ein Klon, mit einer zweifach höheren Signalintensität (Test zu Referenz) als differenziell exprimiert angesehen werden kann. Beim Nylon-Array konnte bei einem Grenzwert von 2,0 67% (41 von 61) der detektierten Klone als differenzielle verifiziert werden, mit Glas-Mikroarrays waren es 64% (39 von 61). Je weiter der Grenzwert „nach oben“, also zu höheren Quotienten verschoben wird, desto sicherer findet man differenzielle Klone.

² Southern Blots, die cDNS von Tester und Treiber enthalten.

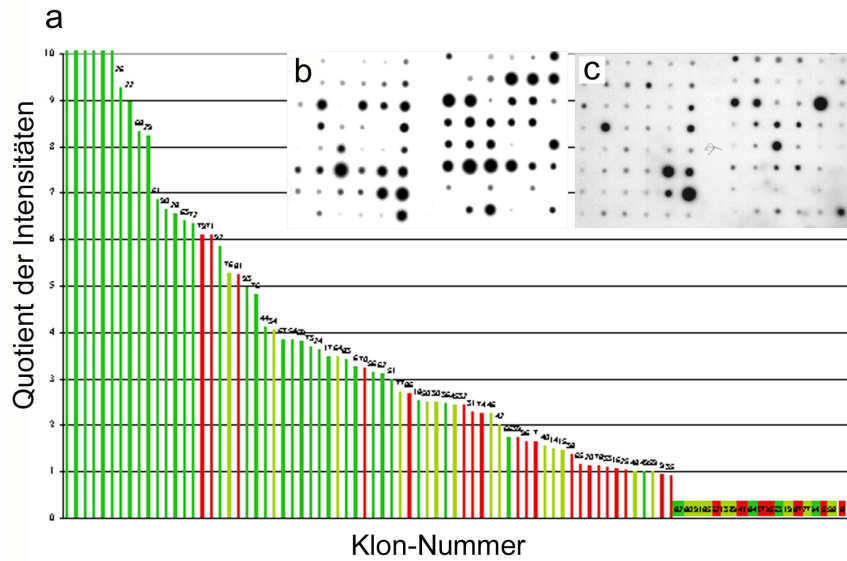


Abbildung 5.7: Ergebnis der Filter-Hybridisierung und Auswertung.

a: Der Nylon-Filter mit den amplifizierten Inserts der 96 Klone wurde mit dem radioaktiv markierten Produkt der Vorwärts-Subtraktion (16/5-SSH) hybridisiert; **b:** Nylon-Filter mit dem gleichen Klonset nach Hybridisierung des radioaktiv markierten Produktes der Reversen-Subtraktion (5/16-SSH); **c:** Anordnung der Signalintensitäts-Quotienten entsprechend ihrer Größe. Die farbigen Balken symbolisieren den Grad der differentiellen Expression, der anhand von Virtuellen Northern Blots bewertet wurde. Grün: stark differenziell exprimiert (keine Expression im ND-Knockout); hellgrün: schwach differenziell exprimiert (schwache Expression im ND-Knockout im Vergleich zum Wildtyp); rot: Hintergrund der Subtraktion.

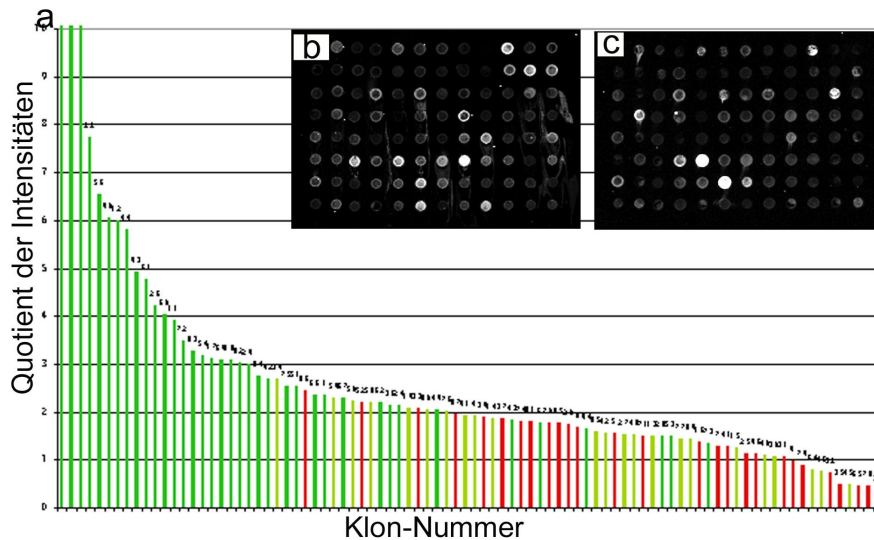


Abbildung 5.8: Ergebnis der cDNS-Mikroarray Hybridisierung und Auswertung.

a: Der cDNS-Mikroarray trägt die gleichen Elemente wie der Nylon-Filter und wurde mit dem Produkt der Vorwärts-Subtraktion (16/5-SSH) (mit Cy3 markiert) hybridisiert; **b:** cDNS-Mikroarray mit dem gleichen Klonset nach Hybridisierung des Cy3 markierten Produktes der Reversen-Subtraktion (5/16-SSH); **c:** Anordnung der Quotienten entsprechend ihrer Größe. Farbige Balken zeigen den Grad der differentiellen Expression (anhand von Virtuellen Blots bewertet). Grün: stark differenziell exprimiert (keine Expression im ND-Knockout); hellgrün: schwach differenziell exprimiert (schwache Expression im ND-Knockout im Vergleich zum Wildtyp); rot: Artefakte der Subtraktion.

5.2.2 Analyse der Reversen-Subtraktionsbank

Zur Isolierung von Transkripten, die eine höhere Abundanz in den Augen von ND-Knockout Mäusen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, wurde eine Reverse-Subtraktionsbank (5/16-SSH) hergestellt. Dafür wurde RNS des gesamten Auges einer 2 Jahre alten ND-Knockout Maus zur Synthese der Tester-cDNS und die eines gleichaltrigen Wildtyp Tieres zur Synthese der Treiber-cDNS verwendet. Aus dieser Subtraktionsbank konnte die differenzielle Expression nur für einen von 38 willkürlich gewählten Klonen durch Analyse auf Virtuellen Northern Blots bestätigt werden. Die Reverse-Subtraktionsbank wurde nicht weiter analysiert.

5.3 Charakterisierung von Subtraktionsbanken durch cDNS-Mikroarrays

5.3.1 Differenzielles Präscreening

Aufgrund der Ergebnisse der detaillierten Analyse der ersten 96 Klone zeigte sich, dass die entwickelte Technik der cDNS-Mikroarrays eine geeignete Möglichkeit darstellt, um differenziell exprimierte Transkripte zu identifizieren. In der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) detektierte ein großer Anteil der Klone differenziell exprimierte Transkripte, die eine Verringerung oder einen kompletten Verlust der Genexpression in den Augen von ND-Knockout Mäusen darstellten. Durch eine erneute, zweite Transformation dieser Bank sollten noch weitere Gene gefunden werden, die im Endstadium der Norrie Krankheit differenziell exprimiert sind. Es wurden zusätzlich 3072 Klone gepickt, PCR-amplifiziert, aufgereinigt und auf Glasobjektträger transferiert. Für die erste Durchmusterung wurde der cDNS-Mikroarray mit fluoreszent markierten Subtraktions-Produkten (Produkt der Vorwärts-Subtraktion: Cy3; Reverse-Subtraktion: Cy5) hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung ist nach Überlagerung der gewonnenen Bilder in einer Falschfarben-Darstellung in Abbildung 5.9 gezeigt. Die Inserts der ersten, bereits gut durch Virtuelle Northern Blots charakterisierten 96 Klone waren ebenfalls auf diesem cDNS-Mikroarray enthalten. Aufgrund der Ergebnisse von dem Pilot-Experiment (5.2.1) wurden Kriterien definiert, die es ermöglichen sollten, weitere cDNS Fragmente zu identifizieren, die differenziell exprimierte Gene repräsentieren. Diese Kriterien waren jedoch stringenter, um den Prozentsatz der tatsächlich differenziellen Klone noch weiter zu erhöhen (Signalintensität >3000, Fläche des Elements >30, Quotient der Signalintensitäten >3,0). 1684 Klone (55%) entsprachen diesen Kriterien.

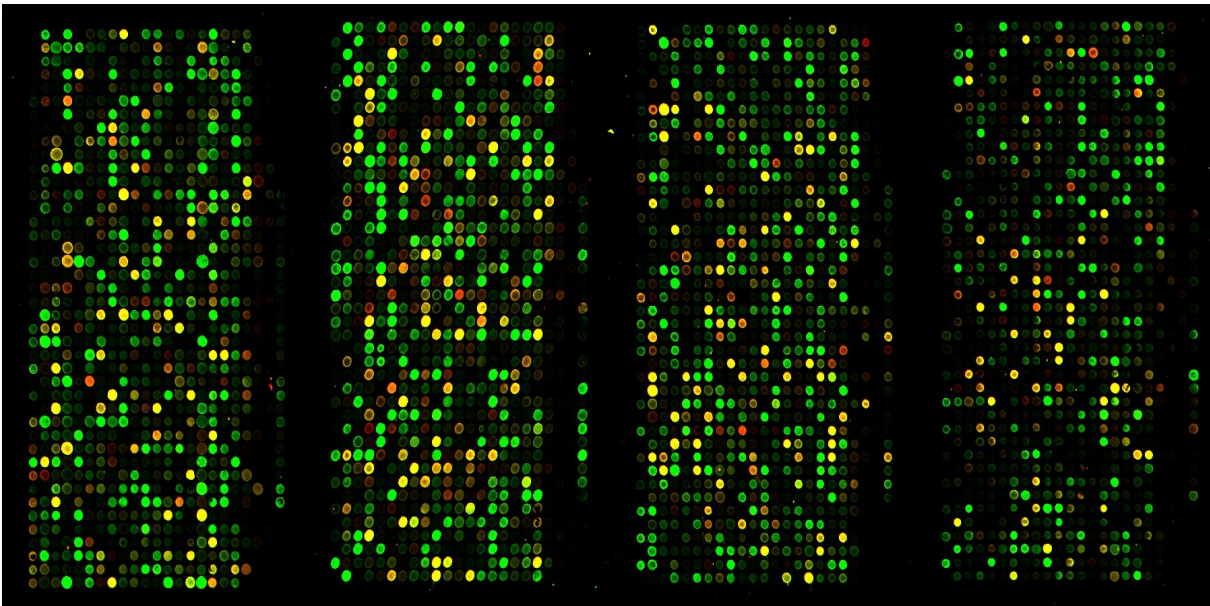


Abbildung 5.9: Ergebnis der Hybridisierung der Subtraktionsprodukte.

Der cDNS-Mikroarray enthält die amplifizierten Inserts von 3072 Klonen der zweiten Transformation der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) und zahlreiche Kontrollen (siehe 5.1.3). Er wurde mit den fluoreszenten Subtraktionsprodukten (16/5-SSH mit Cy3 und 5/16-SSH mit Cy5 markiert) kohybridisiert. Dargestellt ist das Falschfarben-Bild, wobei die Farbe der Spots die Stärke der differentiellen Expression anzeigt. Grün: stark differentiell exprimiert, bzw. keine Expression im ND-Knockout; schwach grün: geringere Expression im ND-Knockout verglichen mit dem Wildtyp; rot: Artefakte der Subtraktion; gelb: gleiches Expressions-Niveau im ND-Knockout wie im Wildtyp.

5.3.2 Redundanz-Screening

Durch eine Transformation kommt es grundsätzlich dazu, dass verschiedene cDNS-Klone, die das gleiche Gen repräsentieren (Redundanz) in der Bank enthalten sind. Dabei können zwei Möglichkeiten unterschieden werden:

- a) ein identisches RsaI-Fragment³ ist mehrfach vertreten oder
- b) unterschiedliche RsaI-Fragmente des gleichen Transkripts sind vorhanden.

Um redundante Klone von der weiteren Analyse auszuschließen, mußten sie durch ein effizientes Screening-Verfahren identifiziert werden. Die Grundidee dabei war, dass durch Hybridisierung eines einzelnen Kloninserts oder einer kompletten cDNS diejenigen Elemente aufgespürt werden können, die das ein redundantes Fragment repräsentieren.

³ Vor der Subtraktion wird die SMART-amplifizierte cDNS zunächst mit RsaI geschnitten, danach mit Adaptoren ligiert und dann subtraktiv-suppressiv hybridisiert, siehe Abbildung 2.1. Daher sind in der Subtraktionsbank nur RsaI-Fragmente der exprimierten Sequenzen vorhanden.

5.3.2.1 Rück-Hybridisierung von Kloninserts

Um möglichst viele redundante Klone in einer Hybridisierung aufzufinden, wurden jeweils 6 bis 14 PCR-amplifizierte Kloninserts in einem Pool zusammengefaßt, fluoreszenzmarkiert und auf den cDNS-Mikroarray hybridisiert. Da es sich beim Redundanz-Screening um einen kontinuierlichen Prozess handelte, wurden immer wieder neue Pools mit verschiedenen Inserts gebildet und hybridisiert, insgesamt waren es 22 Pools mit 212 Inserts, siehe 3.1.5. In der Abbildung 5.10 ist als stellvertretendes Beispiel das Ergebnis einer Hybridisierung von zwei verschiedenen Pools dargestellt. Pool I enthält 9 Inserts (RsaI-Fragmente) von mitochondrialen Genen und detektierte 150 Elemente. Im Pool II wurden 7 RsaI-Fragmente von Augenspezifischen, differenziell exprimierten Genen zusammengestellt, wodurch 46 Elemente detektiert werden konnten. Dieses Redundanz-Screening ermöglicht zwar den Ausschluß der Klone von der weiteren Analyse, es lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Identität des enthaltenen Inserts zu. So könnte es sein, dass z.B. ein Insert aus dem Pool I mit 142 Elementen hybridisiert, wobei die anderen 8 Inserts nur jeweils ein Signal gaben. Die Zusammensetzung der Pools und die Anzahl der durch Rück-Hybridisierung detektierten Elemente ist im Anhang 11.3 aufgeführt.

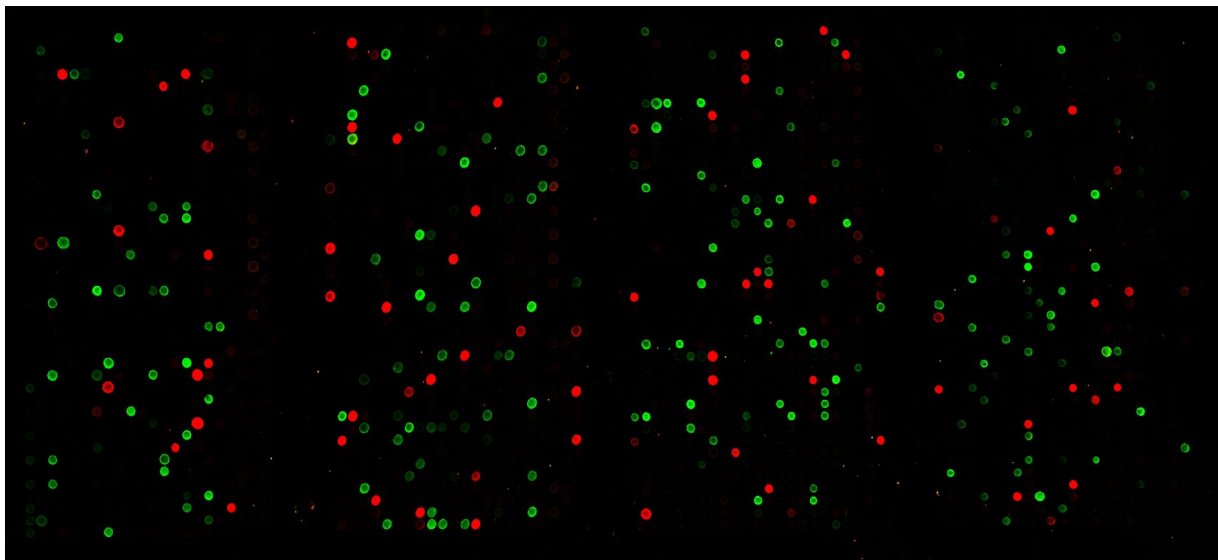


Abbildung 5.10: Redundanz-Screening durch Rück-Hybridisierung von Kloninserts.

Zwei verschiedene Pools wurden fluoreszenzmarkiert (Pool I: Cy3, Pool II: Cy5) und auf den cDNS-Mikroarray hybridisiert, der 3072 Klone aus der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) enthält. Pool I (mitochondriale Gene) enthielt 9 RsaI-Fragmente und gab mit 150 Elementen ein Signal (in Grün dargestellt), Pool II (Augen-spezifische, differenziell exprimierte Gene) enthielt 7 RsaI-Fragmente und detektierte 46 Elemente (Rot).

Basierend auf den Ergebnissen der Rück-Hybridisierung konnte eine vorsichtige Abschätzung der in der Vorwärts-Subtraktionsbank enthaltenen Gentranskripte erfolgen. Im Durchschnitt

detektierte ein RsaI-Fragment 2,7 Elemente in der Hybridisierung. Um zu ermitteln, wieviele RsaI-Fragmente im Mittel in einem Transkript enthalten sind, wurden 11 komplette cDNS durch Datenbankanalyse bzw. Sequenzierung vollständiger RT-PCR-Produkte untersucht⁴. Das Ergebnis war, dass ein Transkript durchschnittlich 5 RsaI-Fragmente enthält. Korrespondierend zu diesen Zahlen repräsentieren alle (n=3072) Klone der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) 228 unterschiedliche Transkripte. Werden nicht die Durchschnittswerte, sondern die Einzelwerte zur Berechnung der Transkript-Zahl verwendet, wird deutlich, dass die erhaltenen Zahlen sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern, siehe Abbildung 5.11.

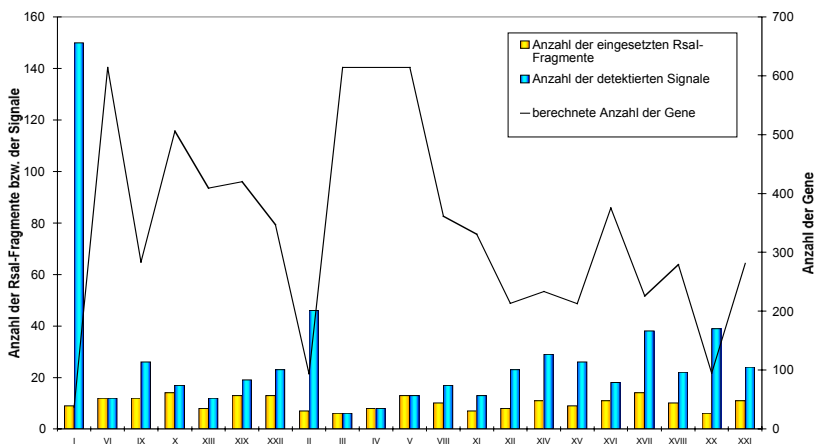


Abbildung 5.11: Durch Rück-Hybridisierung erzielte Ergebnisse.

Auf der x-Achse sind die zur Rück-Hybridisierung eingesetzten Pools dargestellt, die linke y-Achse zeigt die Anzahl der im jeweiligen Pool enthaltenen RsaI-Fragmente (orange) und die dadurch detektierte Anzahl der Elemente (blau). Auf der rechten y-Achse ist die daraus berechnete Anzahl der Gene dargestellt (schwarze Linie). Die Zusammensetzung der Pools ist im Anhang 11.3 aufgeführt.

5.3.3 Hybridisierung von kompletten cDNS

Eine weitere Möglichkeit des Redundanz-Screenings bestand in der Hybridisierung von kompletten cDNS. Für ausgewählte Transkripte (siehe 3.1.3) wurden durch RT-PCR vollständige cDNS, ausgehend von Gesamtaugen RNS, synthetisiert, fluoreszenzmarkiert und paarweise auf den cDNS-Mikroarray hybridisiert. Das Ergebnis einer solchen Hybridisierung ist in der Abbildung 5.12 gezeigt. Dort wurden die kompletten cDNS von Retinoschisin und Arrestin fluoreszenzmarkiert und hybridisiert. Die cDNS von Retinoschisin enthält 11 RsaI-Fragmente, wodurch 21 Elemente detektiert werden konnten. Durch die Hybridisierung der cDNS von Arrestin, die 2 RsaI-Fragmente beinhaltet, wurden 39 Elemente detektiert. Interessanterweise gaben drei Elemente mit beiden cDNS ein Signal. Dabei handelt es sich um chimäre Klone, deren Insert sowohl ein RsaI-Fragment von Retinoschisin als auch von Arrestin enthält. Sämtliche Ergebnisse, die durch das Redundanz-Screening basierend auf kompletten cDNS erhalten wurden, sind im Anhang 11.4 beigefügt.

⁴ Daten von S. Lenzner.

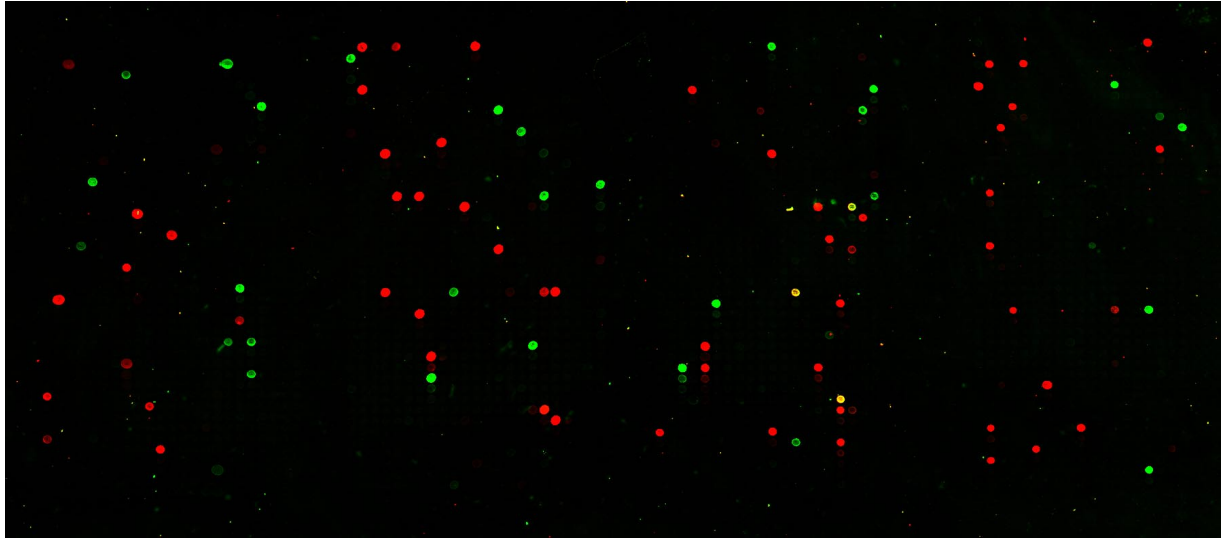


Abbildung 5.12: Redundanz-Screening durch Hybridisierung von kompletten cDNS.

Die cDNS von Retinoschisin wurde mit Cy3 markiert und ist in Grün dargestellt. Sie enthält 11 RsaI-Fragmente und detektierte 21 Signale. Die cDNS von Arrestin (mit Cy5 markiert) hatte 2 RsaI-Fragmente und gab mit 39 Elementen Signale. Drei detektierte Elemente sind in dieser Darstellung gelb, da sie mit beiden cDNS ein Signal ergaben. Die gelben Signale sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Klon, der durch dieses Element repräsentiert wird, RsaI-Fragmente von beiden cDNS enthält.

Anhand der Ergebnisse durch Hybridisierung von kompletten cDNS konnte errechnet werden, dass die eingesetzten Transkripte durchschnittlich 4,6 RsaI-Fragmente enthielten, wodurch 7,8 Elemente detektiert wurden. Hochgerechnet ergibt sich daraus eine Anzahl von 86 verschiedenen Gen-Transkripten, die in der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) enthalten sein können. Auch hier zeigt die grafische Darstellung eine starke Variation zwischen den Einzelergebnissen (Abbildung 5.13).

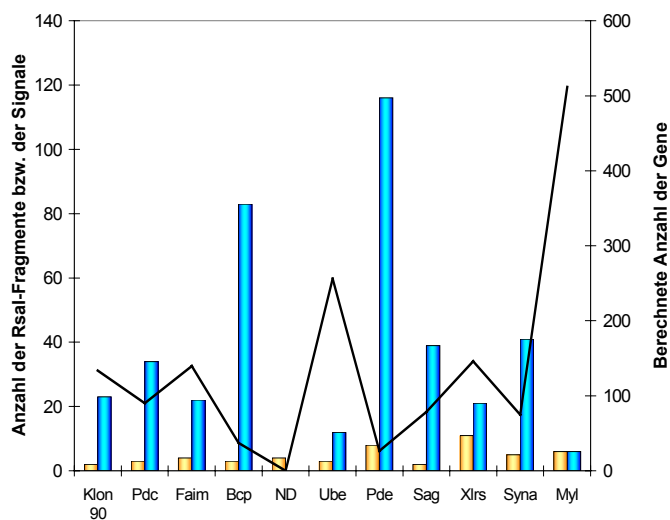


Abbildung 5.13: Hybridisierung kompletter cDNS.

Auf der x-Achse sind die Genkürzel der kompletten cDNS dargestellt. Die linke y-Achse zeigt die Anzahl der RsaI-Fragmente (orange) und die dadurch detektierten Elemente (blau). Auf der rechten y-Achse ist die daraus errechnete Anzahl der Transkripte dargestellt (schwarze Linie). Hier ist eine sehr unterschiedliche Präsenz der Gentranskripte in dieser Bank zu erkennen. Die Hybridisierung mit der ND-cDNS ergab kein Signal, wohingegen die cDNS von Pde 116 Signale detektierte. Die daraus berechnete Genzahl variiert demzufolge sehr stark. Folgende Genkürzel wurden verwendet: Pdc: Phosduzin, Faim: Fas Apoptose-inhibierendes Molekül; Bcp: Blaues Zapfenpigment; ND: Norrie Krankheit; Ube: Ubiquitin-konjugierendes Enzym; Pde: Phosphodiesterase; Sag: Arrestin; Xlrs: Retinoschisin; Syna: Synaphin Homolog; Myl: Myelin Homolog.

5.3.4 Bestätigung der differentiellen Expression

Durch das Screening konnten 936 Klone von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, 348 vermutlich differentiell exprimierte Klone blieben zur detaillierten Charakterisierung übrig. Davon wurden 333 mit Virtuellen Northern Blots auf ihre Expression in 2 Jahre alten ND-Knockout Mäusen und im gleichaltrigen Wildtyp untersucht. Die VNBs enthielten cDNS, die aus Gesamt-RNS aus den Augen von ND-Knockout und Wildtyp Mäusen synthetisiert wurde. Eine differentielle Expression wurde für 71% (236 der 333 Klone) bestätigt, wobei die jeweiligen Transkripte entweder vollständig in der Augen-RNS von ND-Knockout Tieren fehlten oder ein verringertes Expressions-Niveau zeigten. Diese differentielle Expression konnte für einen Teil dieser Klone auf einem unabhängigen, zweiten Tierpaar (ND-Knockout und Wildtyp) bestätigt⁵ werden. Durch Sequenzierung und Datenbankrecherche ergab sich, dass 13 der differentiell exprimierten Gene Orthologe von humanen retinalen Krankheitsgenen darstellen, die in verschiedenen Formen von Photorezeptor-Degenerationen involviert sind. Die Identität der Gene ist im Anhang 11.5 aufgeführt. Zusätzlich zu den bekannten Genen wurden mehr als 50 neue Gene identifiziert, von denen einige für Polypeptide mit Homologien zu bekannten Proteinen kodieren.

5.4 Optimierung für Expressionsanalysen mit limitiertem Augenmaterial

5.4.1 Vergleich verschiedener Markierungsmethoden

Nachdem die technischen Voraussetzungen der cDNS-Mikroarrays geschaffen waren und ein Großteil der Vorwärts-Subtraktionsbank (16/5-SSH) charakterisiert war, bestand der nächste Schritt darin, eine effiziente und verzerrungsfreie Methode zur Markierung von minimalen RNS-Mengen zu etablieren. Da zur Expressionsanalyse mit Augenmaterial nur sehr limitierte Mengen an Gesamt-RNS zur Verfügung stehen, mußte entweder ein sehr leistungsfähiges Verfahren zur direkten RNS-Markierung angewandt oder eine Amplifikation durchgeführt werden. Das Ziel dabei war es, die ursprünglichen Transkript-Verhältnisse des untersuchten Target zu erhalten und gleichzeitig ein sehr sensitives Verfahren zu etablieren. Grundsätzlich kann jedes Markierungsverfahren – mit oder ohne Amplifikation – zu einer Verzerrung führen. Um solch eine Verzerrung abzuschätzen, wurden exakt quantifizierte Mengen Gesamt-RNS aus ein und

⁵ Es handelt sich hierbei um teilweise unveröffentlichte Daten von S. Lenzner.

derselben Quelle in zwei Aliquots aufgeteilt, mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und auf einen Mikroarray kohybridisiert (Abbildung 5.14).

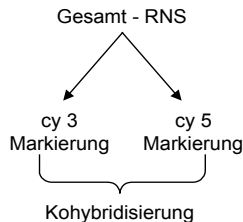


Abbildung 5.14: Ansatz zur Einschätzung der Verzerrung.

Gesamt-RNS aus einer Quelle wurde in zwei Fraktionen geteilt, separat mit Cy3 und Cy5 markiert und dann in einer Kohybridisierung vereint.

Um die biologische Variation möglichst gering zu halten, wurde eine ausreichende Menge an Gesamt-RNS aus den Augen von Wildtyp Mäusen verschiedener Altersstadien gepoolt, exakt quantifiziert und in Aliquots aufgeteilt, sodass alle Experimente mit der gleichen RNS durchgeführt werden konnten. Die fluoreszenzmarkierten Targets wurden in einer Kohybridisierung auf cDNS-Mikroarrays hybridisiert, die 3842 Elemente (Vorwärts-Subtraktionsbank, Haushaltsgene, Positiv- und Negativkontrollen) enthielten. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Bei der Auswertung der Hybridisierungs-Daten wurden entsprechende Grenzwerte festgelegt (Signalintensität > 3.000, Spot-Fläche > 30) und über die Grundgesamtheit aller Elemente normalisiert. Elemente die ein entsprechendes Signal ergaben und deren kalibrierter Quotient kleiner als 0,5 oder größer als 2 war, wurden als falsch Positive bewertet.

5.4.1.1 Verfahren ohne Amplifikation

Bei den Verfahren zur Markierung ohne Amplifikation wird zwischen direkter und indirekter Markierung unterschieden. Die Markierung mit *Superscript II* und *CyScribe* ist methodisch sehr ähnlich, unterscheidet sich jedoch durch die verwendete reverse Transkriptase und die erforderliche, minimale Ausgangsmenge an Gesamt-RNS (25 µg und 10 µg). Durch Verwendung von *CyScribe* kam es zu einer stärkeren Verzerrung, bei einer geringeren absoluten Anzahl an Signalen im Vergleich zu *Superscript II*. Ebenso wurden sehr viele falsch-positive Signale detektiert (*CyScribe*: 326 von 601; *Superscript II*: 23 von 898, siehe Abbildung 5.15 a-d und Tabelle 5.2). Demgegenüber wurden durch die Markierung Aminoallyl-modifizierter cDNS die meisten und auch die stärksten Signale von den direkten Verfahren detektiert. Zudem wies diese Methode den geringsten Anteil an falsch Positiven auf (2 von 959; 0,2%, siehe Abbildung 5.15 e-f und Tabelle 5.2). Anhand der x-y-Diagramme und der zahlenmäßigen Auswertung kann

die Aussage getroffen werden, dass dies eine verzerrungsfreie Methode ist. Diese Ergebnisse wurden bei den Verfahren ohne Amplifikation nur noch durch die indirekte Markierung mit Dendrimern übertroffen, wofür eine sehr geringe Menge (2,5 µg) Gesamt-RNS erforderlich war. Der Anteil der falsch Positiven lag dabei unter 0,2%, die Methode ist demzufolge nahezu verzerrungsfrei (Abbildung 5.15 g-h und Tabelle 5.2).

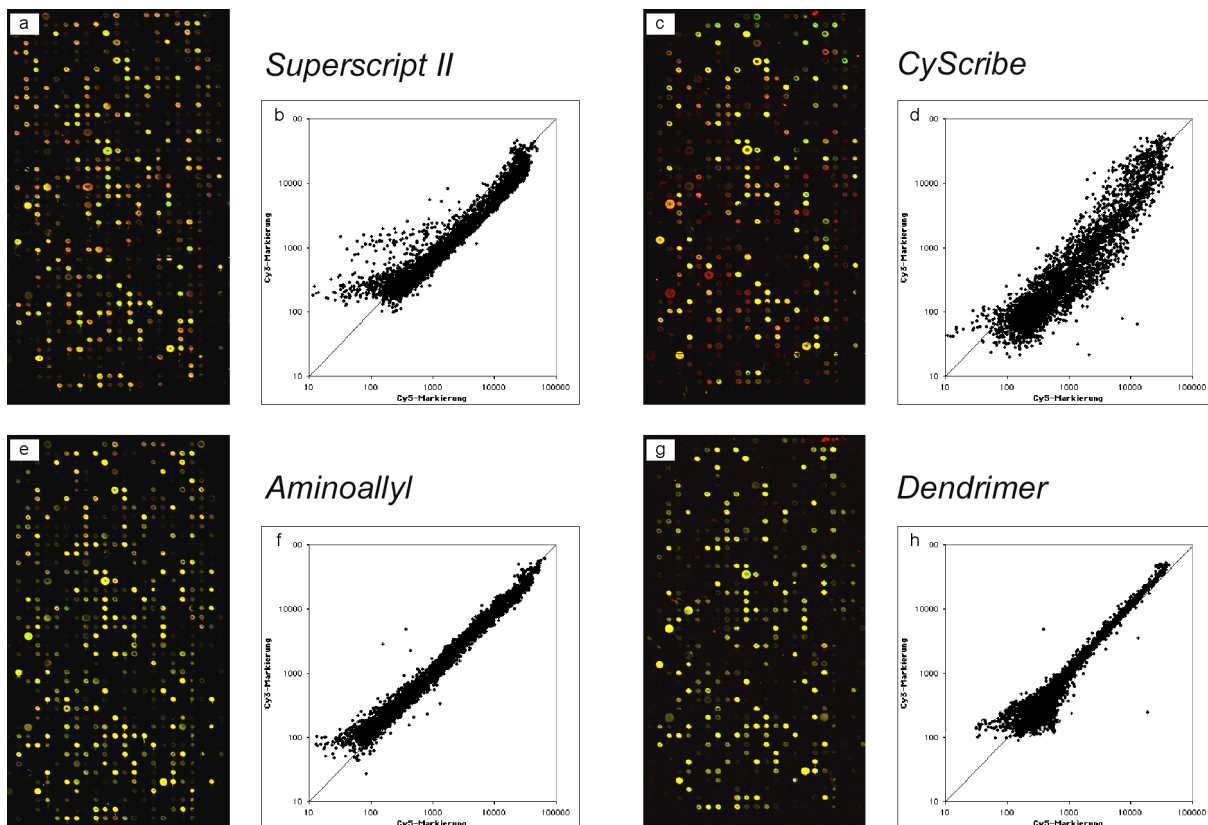


Abbildung 5.15: Vergleich verschiedener Verfahren der Markierung ohne Amplifikation.

Um die Verzerrung durch die Markierungsmethode einzuschätzen, wurden exakt quantifizierte Mengen Gesamt-RNS aus ein und derselben Quelle in zwei Aliquots aufgeteilt, mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert und auf einem Mikroarray kohybridisiert. Es ist jeweils nur ein Ausschnitt (einer von vier Subarrays) gezeigt, die erhaltenen Datensätze wurden in einem x-y-Diagramm dargestellt. Gelbe Signale zeigen eine verzerrungsfreie Markierung an, wo die RNS gleichermaßen mit Cy3 und mit Cy5 markiert wurde. Wenn Transkripte stärker mit Cy3 (grün) oder mit Cy5 (rot) markiert wurden, sind sie direkt als Artefakte zu erkennen. Im x-y-Diagramm reihen sich verzerrungsfrei markierte Transkripte entlang der Diagonalen auf. Eine Methode bei der z.B. unverhältnismäßig stark Cy3 inkorporiert wurde, ist durch eine Punktwolke im oberen linken Quadranten zu erkennen. a+b: SSII; c+d: CyScribe; e+f: Aminoallyl; g+h: Dendrimer.

5.4.1.2 Verfahren mit Amplifikation

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

Das kommerzielle Tyramid-System ermöglichte nach der Hybridisierung eine enzymatische Amplifikation der Signale, wobei die unterschiedlich modifizierten Nukleinsäuren sequentiell detektiert wurden. Bemerkenswert ist die Art der erzeugten Signale (Abbildung 5.16), die selten homogen die Fläche des Elementes bedeckten⁶. Mit dieser Methode konnten vergleichsweise viele Signale detektiert werden, von denen 3% falsch positiv (68 von 2111) waren (Abbildung 5.17 a-b und Tabelle 5.2). Die falsch positiven Signale zeigten ebenfalls eine Besonderheit, da immer die selben Elemente stärkere Signale durch den Nachweis mit dem Cy5-Tyramid ergaben.

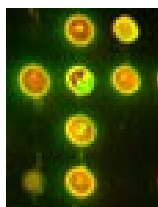


Abbildung 5.16: Signale, die durch das Tyramid-System erzeugt wurden.

Die *in vitro* Transkription stellt ein amplifikatives Verfahren der Markierung dar, bei der cRNS linear amplifiziert und anschließend durch Random Priming markiert wird. Zwei grundsätzlich ähnliche Methoden wurden verglichen. Das modifizierte Eberwine Protokoll lieferte zu kleine cRNS Fragmente (<500 bp), die zu einem nicht auswertbaren Ergebnis führten. Dahingegen ergab die *in vitro* Transkription in Verbindung mit den SMART-Komponenten wesentlich längere cRNS Fragmente (bis zu > 4 kb), die nach Fluoreszenzmarkierung sehr viele Signale mit sehr hoher Intensität zeigten (Abbildung 5.17 c-d). Jedoch war ein Fünftel (21%; 235 von 1134) falsch positiv (Tabelle 5.2). Eine starke Verzerrung ist sowohl auf dem Bild nach der Hybridisierung als auch im x-y-Diagramm zu erkennen.

Die PCR-basierte cDNS-Amplifikation nach der SMART-Methode und nachfolgender Markierung mittels Random Priming lieferte die meisten und auch die stärksten Signale von allen verglichenen Methoden, wobei der Anteil an falsch positiv detektierten Signalen sehr gering war (0,2%, 6 von 2873) (Abbildung 5.17 e-f und Tabelle 5.2). Das Random Priming stellte im Vergleich zur Nicktranslation (DNS-Ersatzsynthese) eine sehr gute Methode zur Markierung von cDNS dar, da es durch Strangverdrängung zu einer DNS-Neusynthese kommt.

⁶ Durch das in dieser Arbeit zur Spot-Analyse angewandte Verfahren der Target-Separation nach Mann-Whitney konnten Signalintensität und Fläche dieser inhomogenen Signale sehr gut identifiziert werden.

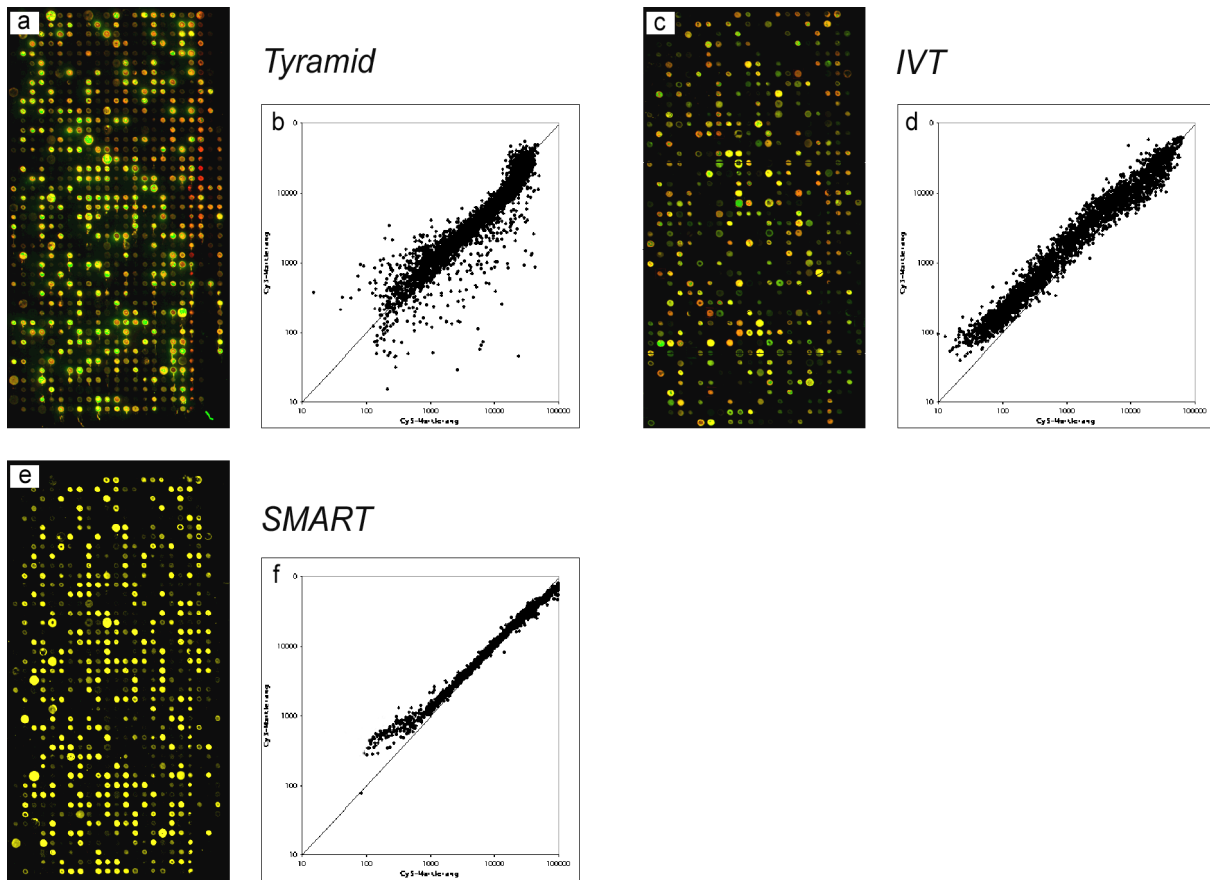


Abbildung 5.17: Vergleich verschiedener Verfahren der Markierung mit Amplifikation.

Die Verzerrung durch amplifikative Methoden wurde durch die separate Markierung zweier Aliquots von RNS aus einer Quelle beurteilt. Es ist jeweils ein Subarray von vieren und das x-y-Diagramm gezeigt. Gelb: Verzerrungsfreie Markierung. Transkripte, die stärker mit Cy3 (grün) oder mit Cy5 (rot) markiert wurden, sind als Artefakte im Bild und im x-y-Diagramm zu erkennen. a+b: Tyramid; c+d: *in vitro* Transkription; e+f: SMART mit Random Priming.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der verschiedenen Verfahren zur Markierung von minimalen Mengen an Gesamt-RNS.

Verfahren der Markierung	ohne Amplifikation				mit Amplifikation			
	direkt			indirekt	RNS-Amplifikation		Signal amplifikation	PCR-basierte Amplifikation
	SSII	Cy Scribe	Aminoallyl	Dendrimer	IVT	IVT + SMART	Tyramid-System	SMART-cDNS Synthese
Signale* >3.000; >30	898	601	959	626	----	1134	2111	2873
Signale* >10.000; >30	404	268	432	302	----	606	1255	1912
falsch Positiv**	23	326	2	1	----	235	68	6
RNS-Menge [µg]	25	10	10	2,5	1	1	1	1

* Die Anzahl der detektierten Signale bezieht sich auf 3842 Elemente, die insgesamt auf diesem cDNS Mikroarray waren. >3.000 bedeutet: Das Signal mußte minimal eine Intensität von 3.000 haben; >30 bedeutet: Die Fläche, in dem das Signal detektiert wurde mußte größer als 30 Pixel sein.

** Die Detektionsgrenzen lagen bei >3.000; >30; >2 und <0,5, d.h. wenn ein Signal eine Intensität von mehr als 3.000 und eine Fläche von mindestens 30 hatte und der Quotient über 2 oder unter 0,5 liegt, dann ist es ein falsch positives Signal.

5.4.2 Vergleich von Targets unterschiedlicher Komplexität und Anreicherung

Differenziell exprimierte Gene können, in Abhängigkeit von Komplexität und Anreicherung eines Targets, mit unterschiedlicher Treffsicherheit detektiert werden. Je größer die Anzahl an unterschiedlichen Transkripten in einem Target ist, desto höher ist dessen Komplexität. Ein Target mit sehr hoher Komplexität kann Transkripte enthalten, die aufgrund ihrer geringen Abundanz durch die cDNS-Mikroarray Technik nicht nachweisbar sind. Durch eine Amplifikation oder Subtraktion können auch schwach exprimierte Transkripte detektiert werden, wobei jedoch die Gefahr der Verzerrung der ursprünglichen Expressionsverhältnisse besteht (siehe 5.4.1.2). Für einen Vergleich der verschiedenen Targets mit unterschiedlicher Komplexität und Abundanz wurde als Ausgangsmaterial Gesamt-RNS aus Augen zwei Jahre alter ND-Knockout und Wildtyp Mäuse verwendet. Eine amplifizierte cDNS und ein Subtraktionsprodukt wurden im Vergleich zur RNS auf ihre Eigenschaft untersucht, verifiziert differenzielle Transkripte zu detektieren. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde RNS (4 µg) nach der Erststrang-Synthese mit Dendrimeren markiert, das amplifizierte Target wurde durch SMART-Synthese (1 µg) hergestellt und durch Random Priming fluoreszent markiert. Durch Random Priming wurde auch das Subtraktionsprodukt (1 µg) markiert. Die jeweiligen Targets wurden auf einen cDNS-Mikroarray hybridisiert, der 5280 Elemente enthielt (96 und 3072 aus der 16/5-SSH Bank, 1278 Retina- und Apoptose-spezifische Klone aus dem RZPD und das Set der Kontrollen). Unter Verwendung von Schwellenwert-Kriterien (Signalintensität >3000, Fläche >30) wurden Klone mit einem Signalintensitäts-Quotienten >2 als potenziell differenziell exprimiert angesehen. Die Beurteilung der differenziellen Expression basierte auf den bereits erwähnten 236 gut charakterisierten und einzeln durch Virtuelle Northern Blot bestätigten Klonen (5.3.4). Die Ergebnisse der Hybridisierung und der Datenanalyse sind in der Abbildung 5.18 a-f gezeigt. Differenziell exprimierte Transkripte werden in der Falschfarben-Darstellung als grüne Signale gezeigt, gleich stark exprimierte als gelbe Signale. Anhand dieser Bilder ist zu erkennen, dass sowohl durch das amplifizierte als auch durch das subtrahierte Target deutlich mehr differenzielle Elemente detektiert werden als mit der RNS. Die gesamte Anzahl der potenziell differenziell exprimierten Transkripte beträgt beim RNS-Target 295 von 5280 Elementen (6%). Demgegenüber werden durch das SMART-amplifizierte Target 700 Elemente (13%) und durch das Subtraktionsprodukt 1207 Elemente (23%) der insgesamt 5280 auf dem Mikroarray vorhandenen Elemente detektiert. Mit Bezug auf die 236 verifiziert differenziell exprimierten Klone, wurden durch das RNS-Target 22 % (52 von 236) richtig detektiert. Mit dem SMART-amplifizierten Target waren es 51% (121 von 236) und mit dem Subtraktionsprodukt 96% (227 von 236). Im Gegensatz zu RNS- und SMART-amplifizierten Targets ergab die Hybridisierung der Subtraktionsprodukte auch rote Signale (Abbildung 5.18 e) bzw. solche die im unteren rechten Quadranten des x-y-Diagrammes lagen (Abbildung 5.18 f).

Diese Signale zeigen eine vermeintliche differenzielle Expression (im ND-Knockout höher als im Wildtyp).

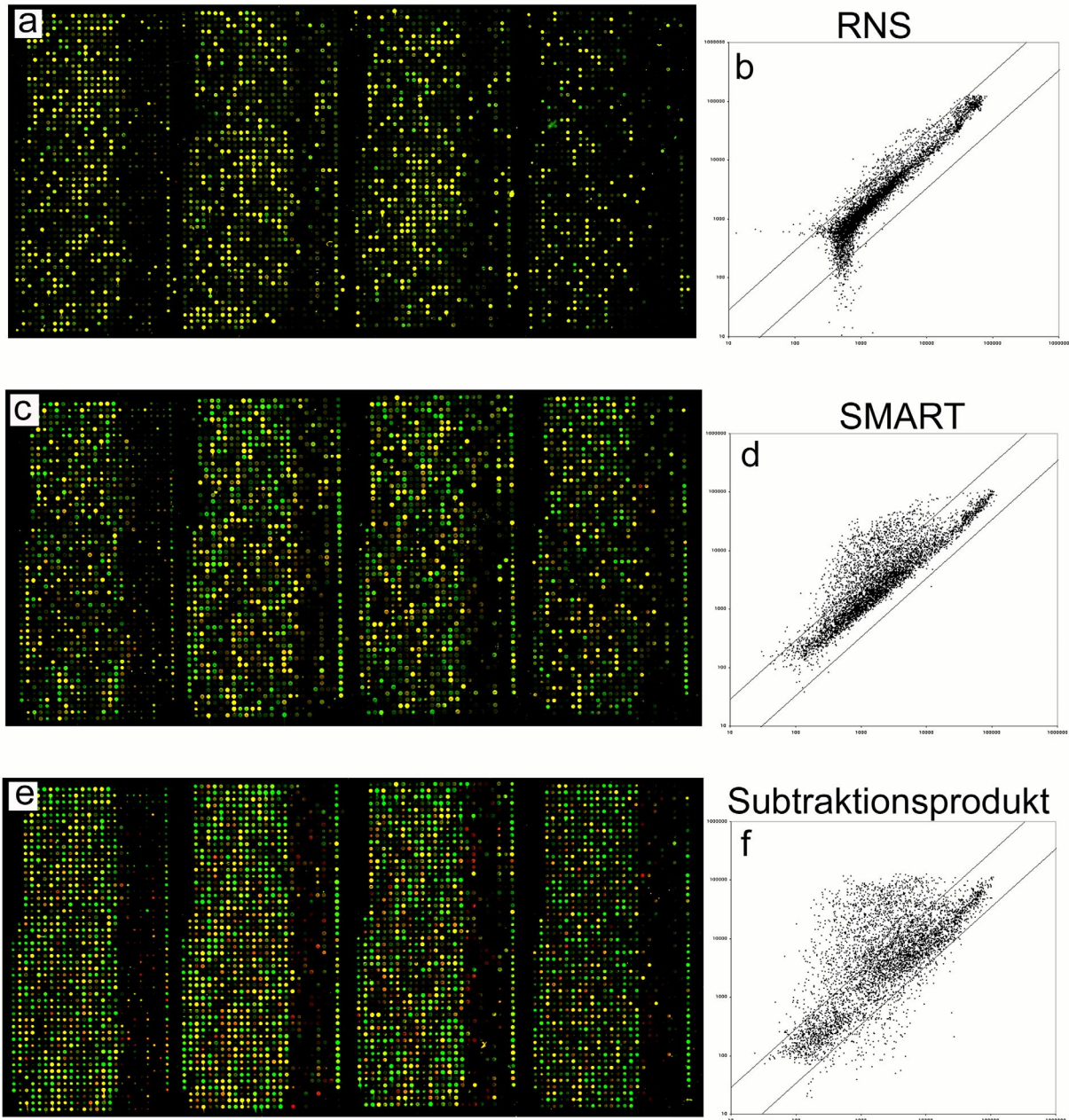


Abbildung 5.18: Detektion differenzieller Expression durch Targets unterschiedlicher Komplexität.

Das Ausgangsmaterial zur Synthese verschiedener Targets war Gesamt-RNS aus Augen zwei Jahre alter ND-Knockout und Wildtyp Mäuse. Die Targets wurden nach der Fluoreszenzmarkierung auf einen cDNS-Mikroarray mit 5280 Elementen hybridisiert. Links ist jeweils das Falschfarben-Bild dargestellt, rechts das Ergebnis der Datenanalyse in einem x-y-Diagramm. a und b: RNS-Target das durch Dendrimer-Technik generiert wurde; c und d: SMART-amplifiziertes Target, durch Random Priming markiert; e und f: Subtraktionsprodukte (Vorwärts- und Reverse-SSH) mit Random Priming markiert. In der Falschfarben-Darstellung zeigt die Farbe des Elements die jeweilige Expressionsstärke an. Dabei bedeutet grün eine schwache oder nicht vorhandene Expression im ND-Knockout im Vergleich zum Wildtyp; Gelb zeigt ein gleichermaßen starke Expression in beiden Targets an; Rot zeigt das vermeintlich stärkere Vorhandensein von Transkripten im ND-Knockout an. Die Linien in den x-y-Diagrammen stellen die Grenzen der zweifachen differenziellen Expression dar, wobei im oberen linken Quadranten diejenigen Signale mit einer geringeren Expression im Knockout gegenüber dem Wildtyp liegen.

5.5 Genexpressionsstudie in der ND-Knockout Maus

Um die Krankheitsprogression der Norrie Krankheit zu untersuchen, wurde eine Verlaufsstudie mit verschiedenen Altersstadien betroffener Mäuse durchgeführt. Die sehr breit angelegte Studie diente dazu, Veränderungen auf Transkriptebene im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Um den Einfluß biologischer Variationen zu erfassen und zu berücksichtigen wurden jeweils drei verschiedene Tierpaare der gleichen Altersstufe herangezüchtet. Zu sieben verschiedenen Zeitpunkten wurden die Augen von ND-Knockout und gleichaltrigen Wildtyp Mäusen entnommen, um Gesamt-RNS zu isolieren. Basierend auf den Ergebnissen bisheriger Vergleichsexperimente wurden die Targets für die Genexpressionsstudie parallel mit Dendrimeren markiert und durch die SMART-Technik amplifiziert.

5.5.1 Expressionsanalyse basierend auf RNS-Targets

Für die Expressionsanalyse basierend auf RNS-Targets wurde ND-Knockout immer mit Cy5- und Wildtyp mit Cy3-Dendrimeren markiert und komparativ auf den 5280 Elemente Mikroarray hybridisiert. Insgesamt wurden 21 separate Mikroarrays hybridisiert und ein weiterer nachfolgend zur Absicherung eines Ergebnisses (zusätzliches Tierpaar mit 18 Monaten). Die Bilder und die Datensätze, die durch diese Hybridisierungen erhalten wurden, waren von hoher Qualität, so dass alle Ergebnisse für die Auswertung verwendet werden konnten. Die 22 Datensätze von der Hybridisierung dendrimermarkierter RNS-Targets wurden nach Normalisierung unter Verwendung des Programmes Cluster analysiert. Die Datensätze wurden zunächst gefiltert, dazu wurden Schwellenwert-Kriterien (Signalintensität >3000, Spot-Fläche >30) angelegt, sodass für jedes Element in 80% der Experimente ein Wert vorhanden sein mußte. Von den 236 repräsentativ ausgewählten Elementen erfüllten 131 diese Kriterien. Die Signalintensitäts-Quotienten dieser Elemente wurden mit dem binären Logarithmus transformiert und aufgrund ihrer metrischen Ähnlichkeit hierarchisch geclustert. Das Resultat, in Form einer Matrix, wurde dann in TreeView visualisiert und mit Excel in ein Falschfarben-Bild umgewandelt, damit die wesentlichen Unterschiede besser dargestellt werden konnten. Die normalisierten Datensätze sind in Form von x-y-Diagrammen in der Abbildung 5.19 dargestellt. Das erhaltende Dendrogramm ist in Abbildung 5.20 gezeigt. Sowohl in den x-y-Diagrammen als auch im Dendrogramm ist besonders die Zunahme der potenziell differenziellen Signale im zeitlichen Verlauf deutlich zu erkennen.

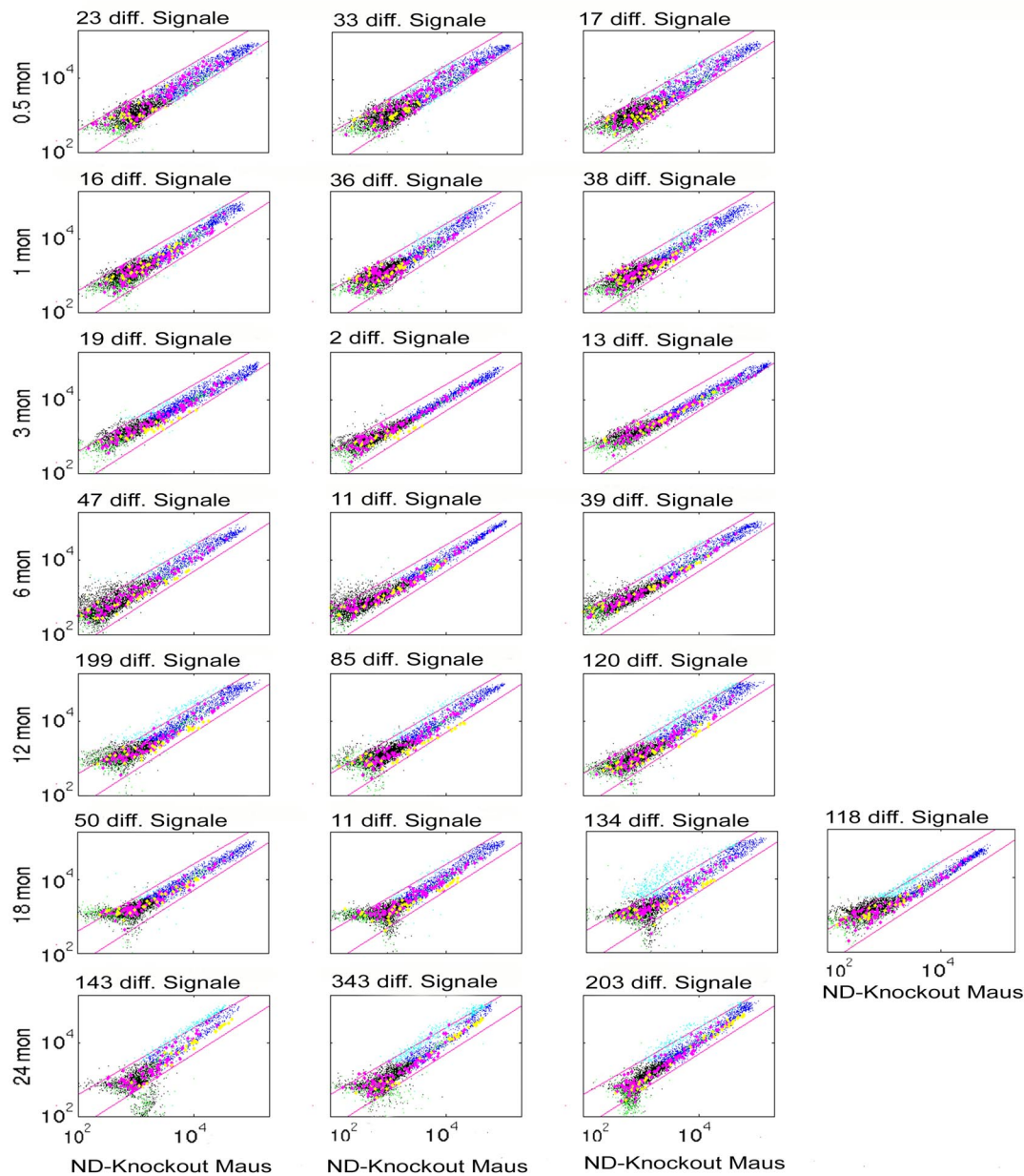


Abbildung 5.19: Hybridisierung dendrimermarkierter Targets zur Analyse der zeitlichen Veränderung der Genexpression.

Untersucht wurden sieben verschiedene Altersstadien von 0,5 bis 24 Monaten (Bezeichnung links außen), mit jeweils mindestens drei unabhängigen Tierpaaren (ND-Knockout und Wildtyp). Insgesamt wurden 22 verschiedene Experimente durchgeführt. Dazu wurden jeweils 4 μg Gesamt-RNS aus den Augen einer ND-Knockout und einer Wildtyp Maus mit der Dendrimer-Technik fluoreszenzmarkiert (ND-Knockout: Cy5, Wildtyp: Cy3). Die durch Hybridisierung erhaltenen Signalintensitäten sind logarithmisch aufgetragen (ND-Knockout auf der Abszisse, Wildtyp auf der Ordinate). Die Normalisierung wurde anhand der Haushaltsgene (pink) durchgeführt und basiert auf dem von Chen *et al.* [1997] beschriebenen Algorithmus. Zur Hintergrundkorrektur wurde jeweils das 5% Quantil subtrahiert [Beissbarth *et al.*, 2000]. Die Signale sind farblich unterschieden: gelb: spike-mRNAs, grün: negativ kontrollierte Elemente (leeres Element, 3xSSC, poly(dA), Cot1 DNS), blau: Elemente mit einer Signalintensität >3000 , Spot-Fläche >30 , hellblau: potenziell differenzielle Signale nach Chen-Algorithmus [Chen *et al.*, 1997], schwarz: Hintergrundsignale (Signalintensität <3000 , Spot-Fläche <30 , durchgezogene Linien: zweifache Standardabweichung). Über den einzelnen x-y-Diagrammen ist jeweils die Anzahl der nach Auswertung und Normalisierung (siehe 5.1.4) erhaltenen potenziell differenziellen Signale angegeben, wobei diese Zahlen keine Auskunft über die Stärke der differenziellen Expression geben. Ebenso sind in einigen Fällen nicht alle Signale zu erkennen, da sie übereinander liegen. Deutlich ist eine zeitliche Zunahme der Signale zu erkennen, die besonders in den Augen älterer ND-Knockout Mäuse eine veränderte Genexpression anzeigt.

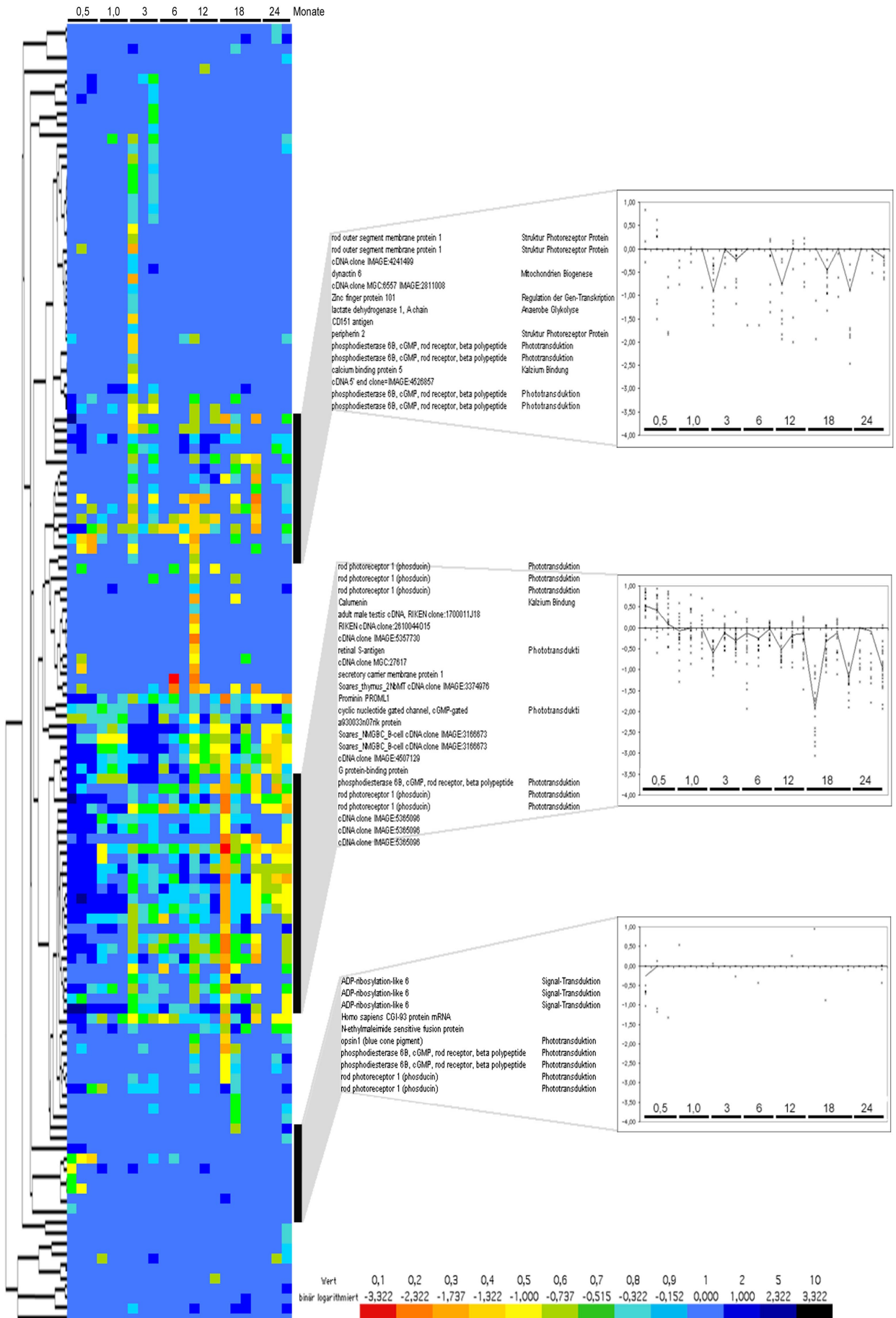


Abbildung 5.20: Dendrogramm nach Clusteranalyse der durch Hybridisierung von RNS-Targets erhaltenen Datensätze.

Das Dendrogramm ist folgendermaßen zu interpretieren: Die Ergebnisse der Zeitverlaufsstudie sind in den Spalten von links nach rechts (0,5 Monate – 24 Monate) dargestellt. In den Zeilen sind die Gen-repräsentierenden Elemente mit dem entsprechenden Farbcode gezeigt. Ganz links im Bild ist die zugrundeliegende Baumstruktur gezeigt. Einige Bereiche des Clusters sind in einer Ausschnittsvergrößerung dargestellt und mit dem Gen-Namen und der funktionellen Klassifizierung versehen. Die zeitliche Änderung der Genexpression ist für die ausgewählten Gene in den Diagrammen auf der rechten Seite zu sehen. Unten rechts im Bild ist der zugrundeliegende Farbcode gezeigt. Rot zeigt eine sehr starke differenzielle Expression an, wobei die entsprechenden Transkripte in den Augen der betroffenen Mäuse sehr viel geringer exprimiert sind als im Wildtyp. Blau zeigt eine gleich starke Expression im ND-Knockout wie im Wildtyp an. Im Dendrogramm ist eine Zunahme der potenziell differenziellen Signale im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Die 24 Monate alten Tiere zeigen die stärksten Veränderungen in ihrer Genexpression. Die vollständige Auflistung der geclusterten Elemente mit den entsprechenden Zahlenwerten, den zugehörigen Gen-Namen und Accession-Nummern ist im Anhang 11.6 aufgeführt.

Die biologische Variabilität der verschiedenen Tierpaare einer Altersstufe ist in diesen beiden Darstellungen gut zu erkennen. Besonders auffällig ist die große Streuung bei den 18 Monate alten Tieren, hier zeigt die RNS von zwei Tierpaaren vergleichsweise geringe Unterschiede in der Expressionsstärke. Demgegenüber weist das dritte Tierpaar sehr starke Unterschiede auf. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurde ein viertes Tierpaar verwendet, um die RNS nach Fluoreszenzmarkierung durch Mikroarrays zu untersuchen. Der Datensatz zeigt ähnliche Werte wie das dritte Tierpaar, mit den starken Veränderungen. Durch die Clusteranalyse wurden Elemente zusammen gruppiert, die funktionell zur Signal- oder zur Phototransduktionskaskade gehören. Diese sind als Ausschnittsvergrößerungen in der Abbildung 5.20 dargestellt. Phosphodiesterase 6b und retinal S-antigen zeigen ab drei Monaten eine veränderte Genexpression. Bei der Phosphodiesterase 6b sind solche Veränderungen bereits nach einem Monat zu erkennen.

5.5.2 Expressionsanalyse mit SMART-amplifizierten Targets

Für diese Zeitverlaufsstudie wurden, ausgehend von den gleichen RNS, SMART-amplifizierte Targets hergestellt. Da mit SMART absolut mehr Signale detektiert werden können, sollte so der Anteil der als differenziell detektierten Signale gesteigert werden. Die Targetsynthese unterschied sich bei den frühen und den späten Altersstadien. Bei den frühen Stadien (0,5 bis 6 Monate) wurde die aus den Augen von ND-Knockout bzw. Wildtyp Mäusen isolierte RNS gepoolt (von jeweils drei Tierpaaren einer Altersstufe). Von den späteren Altersstadien (12, 18 und 24 Monate) wurde aus jeder RNS jeweils eine SMART-cDNS synthetisiert. Danach wurden die cDNS-Targets durch Random Priming fluoreszenzmarkiert. Um Markierungsartefakte experimentell zu berücksichtigen, wurden die Targets jeweils mit Farbtasch markiert. Dazu wurde in einem Experiment das ND-Target mit Cy3 und das Wildtyp-Target mit Cy5 markiert und auf einen Mikroarray kohybridisiert. In einem parallelen Experiment wurde dann das ND-Target mit Cy5 markiert und das vom Wildtyp mit Cy3. Insgesamt wurden 28 separate

Mikroarrays hybridisiert, auch hier wurde ein zusätzliches Experiment der 18 Monate alten Tieren durchgeführt. Die SMART-amplifizierten Targets haben in allen Fällen sehr starke Signale auf den Mikroarrays erzeugt, sodass alle Experimente zur Datenanalyse verwendet werden konnten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.21 in Form von x-y-Diagrammen gezeigt.

Eine starke Zunahme differenzieller Expression ist im zeitlichen Verlauf zu erkennen. In den letzten Altersstadien zeigte ein Fünftel aller Elemente ein differenzielles Signal auf dem Mikroarray. Jedoch ist auch hier die biologische Variation der 18 Monate alten Tiere zu erkennen, die unverhältnismäßig wenig differenziell exprimierte Signale zeigen. Die Unterschiede, die bei den Ergebnissen der RNS-Targets bereits zu erkennen waren treten durch die SMART-cDNS Amplifikation noch deutlicher hervor.

Das spiegelt sich auch in dem Dendrogramm und den entsprechenden Ausschnittsvergrößerungen wider (Abbildung 5.22). Dafür wurden die 28 Datensätze der SMART-amplifizierten Targets nach Normalisierung geclustert (Programm *Cluster*). Dazu wurden die Datensätze zunächst gefiltert (Signalintensität >3000, Spot-Fläche>30, Präsenz der Elemente>80%), wonach von den 236 repräsentativ ausgewählten Elementen 187 übrig blieben. Von den Quotienten der Signalintensitäten wurde der binäre Logarithmus gebildet, der anschließend nach dem Prinzip der metrischen Ähnlichkeit hierarchisch geclustert wurde. Das Resultat, in Form einer Matrix, wurde dann in TreeView visualisiert und mit Excel in ein Falschfarben-Bild umgewandelt (Abbildung 5.22). Dort ist besonders im farblichen Verlauf direkt zu erkennen, dass zwei Tierpaare (18 Mon.) im Vergleich zu den davor (12 Mon.) und dahinter (24 Mon.) liegenden eine viel geringere Veränderung im Genexpressionsmuster aufweisen. Durch das Clustern wurden Elemente zusammen gruppiert, die entweder eine funktionelle Ähnlichkeit aufweisen oder eine gemeinsame biologische Aufgabe erfüllen. Besonders deutlich wird das durch die Redundanz der geclusterten Elemente. Im Gegensatz zur Expressionsanalyse basierend auf RNS-Targets, zeigt Phosduzin erst nach 6 Monaten eine Abnahme in der Expressionsstärke. Die vollständigen Informationen (Zahlenwerte der Quotienten, sämtliche Gen-Namen und zugehörige Accession-Nummern) sind im Anhang 11.7 aufgeführt.

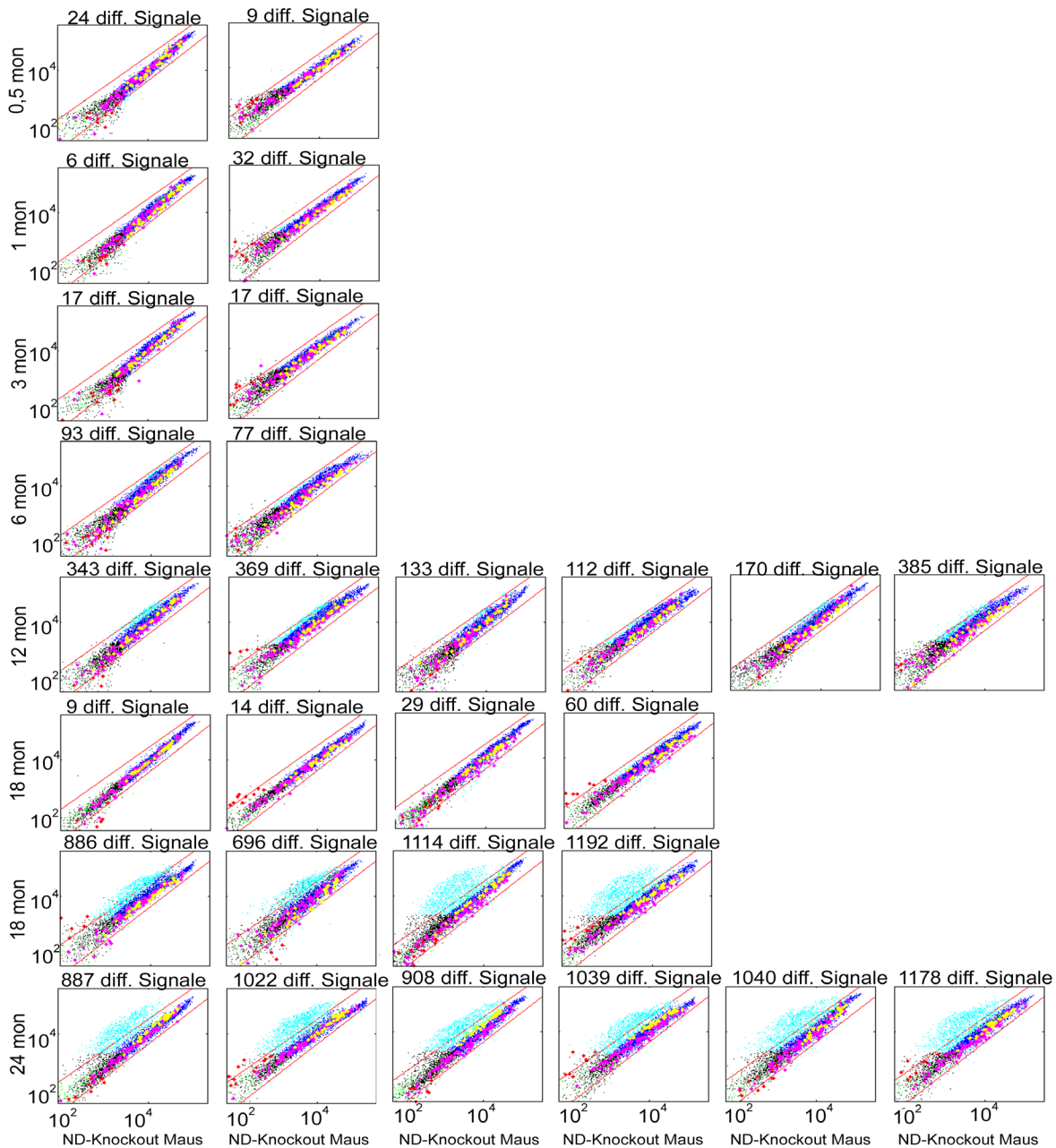


Abbildung 5.21: SMART-amplifizierte Targets zur Analyse der zeitlichen Veränderung der Genexpression.

Sieben verschiedene Altersstadien von 0,5 bis 24 Monaten (Bezeichnung links außen), mit jeweils mindestens drei unabhängigen Tierpaaren (ND-Knockout und Wildtyp), wurden untersucht. Die SMART-Synthesen der frühen Stadien (0,5 bis 6 Monate) basiert auf gepoolter RNS (jeweils drei Tiere gleichen Alters). Von den älteren Stadien wurde die RNS von jedem Tier zur separaten SMART-Synthese verwendet. Die Targets wurden jeweils mit Farbtasch durch Random Priming fluoreszenzmarkiert und kohybridisiert. Insgesamt wurden 28 Hybridisierung-Experimente durchgeführt. Die nach der Bildanalyse erhaltenen Signalintensitäten sind logarithmisch aufgetragen (ND-Knockout auf der Abszisse, Wildtyp auf der Ordinate). Die Normalisierung wurde anhand der Haushaltsgene (pink) durchgeführt und basiert auf dem von Chen *et al.* [1997] beschriebenen Algorithmus. Zur Hintergrundkorrektur wurde jeweils das 5% Quantil subtrahiert [Beissbarth *et al.*, 2000]. Die Signale sind farblich unterschieden: gelb: spike-mRNS, grün: negativ Kontrollen (leeres Element, 3xSSC, poly(dA), Cot1 DNS), blau: Elemente mit einer Signalintensität >3000, Spot-Fläche >30, hellblau: potenziell differenzielle Signale nach Chen-Algorithmus [Chen *et al.*, 1997], schwarz: Hintergrundsignale (Signalintensität <3000, Spot-Fläche <30, durchgezogene Linien: zweifache Standardabweichung. Über den einzelnen x-y-Diagrammen ist jeweils die Anzahl der nach Auswertung und Normalisierung (siehe 5.1.4) erhaltenen potenziell differenziellen Signale angegeben. Es ist eine zeitliche Zunahme der Signale zu erkennen, die besonders in den Augen älterer ND-Knockout Mäuse eine veränderte Genexpression anzeigt.

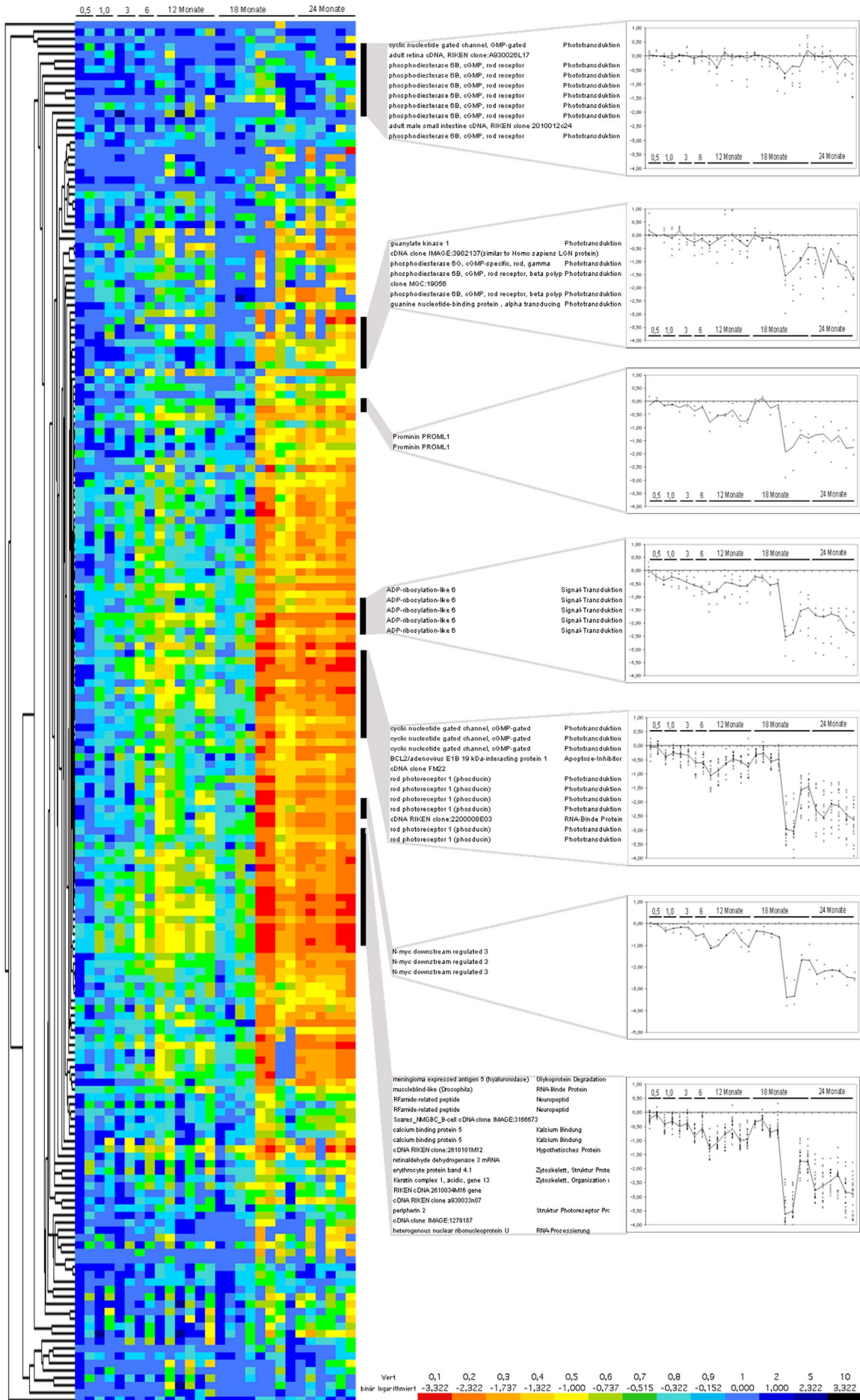


Abbildung 5.22: Dendrogramm nach Clusteranalyse der SMART-Targets.

Die Ergebnisse der Zeitverlaufsstudie sind in den Spalten des Dendrogramms von links nach rechts (0,5 Monate – 24 Monate) angeordnet. In den Zeilen sind die Gen-repräsentierenden Elemente mit dem entsprechenden Farbcode dargestellt, der unten rechts im Bild gezeigt ist. Rot bedeutet eine sehr starke differenzielle Expression, wobei die entsprechenden Transkripte in den Augen der betroffenen Mäuse sehr viel geringer exprimiert sind als im Wildtyp; Blau bedeutet eine gleich starke Expression im ND-Knockout wie im Wildtyp. Im Dendrogramm ist die Zunahme der differenziell exprimierten Gene im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Einige Bereiche des Clusters sind als Ausschnitt vergrößert und mit dem Gen-Namen und der funktionellen Klassifizierung versehen. Das Profil dieser ausgewählten Gene ist ganz rechts im Bild gezeigt. Deutlich ist eine sehr starke differenzielle Expression in den 24 Monate alten Tieren zu sehen, die größtenteils mit 12 Monaten, in einigen Fällen aber auch schon mit 3 Monaten detektierbar ist. Sehr gut ist aufgrund der Redundanz der Elemente zu erkennen, dass durch das Clustern Gene mit einer funktionellen Ähnlichkeit zusammen gruppiert worden sind. Die vollständige Auflistung der geclusterten Elemente mit den entsprechenden Zahlenwerten, den zugehörigen Gen-Namen und Accession-Nummern ist im Anhang 11.7 aufgeführt.

Durch Analyse auf Northern Blots, welche die gleichen Altersstadien von 0,5 bis hin zu 24 Monaten enthielten (*MSN, Multiple Stage Northern*), konnten die durch die Clusteranalysen identifizierten frühen Veränderungen in der Genexpression für einige Gene verifiziert werden⁷. Dort konnte eine beginnende differenzielle Expression ganz schwach bereits ab 1 Monat für Phosphodiesterase und für das blaue Zapfenpigment nachgewiesen werden. Für Phosduzin und retinal S-antigen beginnt sie nach drei Monaten.

⁷ Nicht veröffentlichte Ergebnisse von S. Lenzner