

6 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Expressionsanalysen mit Mikroarrays mit limitiertem Ausgangsmaterial möglich sind. Zur fluoreszenten Markierung von minimalen Mengen an RNS wurden verschiedene hoch effiziente Markierungsmethoden verglichen. Diejenigen Methoden, die bei Aufrechterhaltung der ursprünglichen Transkriptverhältnisse die stärksten und reproduzierbarsten Signale ergaben, wurden für umfangreiche Zeitverlaufsstudien eingesetzt. Dadurch wurde die Krankheitsprogression auf Transkriptniveau untersucht, wodurch ein tieferer Einblick in die Pathogenesemechanismen der Norrie Krankheit gewonnen wurde. Die beobachtete zeitliche Änderung im Genexpressionsmuster zeigte insbesondere sekundäre Veränderungen in den äußeren retinalen Schichten in den Augen von ND-Knockout Mäusen.

6.1 Optimierung wesentlicher Schritte der cDNS-Mikroarray Technologie

Die Grundlage der Mikroarray Technologie ist die Oberflächen-Modifikation und die Immobilisierung der Elemente. Durch serielle Hybridisierungsexperimente - zuerst mit cDNS-Sonden und danach mit komplexen Targets - wurden die experimentellen Rahmenbedingungen optimal für die späteren Expressionsanalysen eingestellt. In Hinsicht auf eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz in Verbindung mit hohen Signalintensitäten, zeigte die Verwendung einer mit γ -Aminopropyl-Silan beschichteten Oberfläche die besten Ergebnisse. Die cDNS wurde durch unspezifische, nicht kovalente Bindung immobilisiert, anschließend wurde die hochgradig bindungsfähige Oberfläche durch eine Lösung mit BSA, SSC und SDS abgesättigt. Ähnliche Ergebnisse hat auch Hedge *et al.* [2000] gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Formamid-basierte Hybridisierungslösung bei 42°C [Pietu *et al.*, 1996] verwendet, die der Wasser-basierten vorgezogen wurde, da sie ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht [Cheung *et al.*, 1999]. Nachteilig wirkt sich bei dieser Lösung allerdings die langsamere Hybridisierungs-Kinetik aus [Casey *et al.*, 1977; Worley *et al.*, 2000]. Die physiko-chemischen Bedingungen der Hybridisierung wurden genau darauf abgestimmt, mit dem minder komplexen Subtraktionsprodukt und mit hochkomplexen RNS exakt diejenigen Signale zu erzeugen, die durch die unabhängige Methode der Virtuellen Northern Blots bestätigt worden sind.

Die Spezifität der Hybridisierung und die erzeugten Datensätze wurden durch ein umfangreiches Set an Positiv- und Negativkontrollen beurteilt. Zusätzlich ermöglichte eine geeignete Auswahl an Haushaltsgenen eine Standardisierung zwischen unterschiedlichen Mikroarrays, die z.B. an verschiedenen Tagen gespottet, hybridisiert oder mit verschiedenen Scannern ausgelesen wurden. Die Notwendigkeit der Standardisierung für interexperimentelle Vergleiche wurde in früheren Arbeiten beschrieben [Beissbarth *et al.*, 2000; Schuchhardt *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2001]. Der Verwendung geeigneter Positivkontrollen in Form von artfremder „spike-mRNS“ [Skena *et al.*, 1995] kommt eine wesentliche Bedeutung bei der qualitativen Beurteilung der eingesetzten RNS, der Markierungsreaktion und der Hybridisierung zu. Unterschiede in der Quantenausbeute und Photostabilität, wie sie bei Randolph *et al.* [1997] beschrieben wurden, konnten dadurch rechnerisch berücksichtigt werden. Verschiedene Mengen von Pflanzen-mRNS, die im Bereich von 1-100 pg zur exakt quantifizierten Gesamt-RNS zugespikt wurden, erlaubten darüber hinaus eine semi-quantitative Beurteilung der Hybridisierungs-Signale, wie auch bei Skena *et al.* [1995] beschrieben. Durch die Negativkontrollen konnte das Auftreten von unspezifischen Hybridisierungs-Signalen eingeschätzt werden. Die Auswahl eines geeigneten Sets nicht regulierter, konstant gleich exprimierter Haushaltsgene ist enorm wichtig aber auch sehr schwierig, insbesondere dann, wenn damit die Daten von Mikroarray-Experimenten normalisiert werden sollen. In umfassenden Arbeiten zu dieser Thematik wurden aus fast 7000 Elementen eines Mikroarrays über Vierhundert potenzielle Haushaltsgene identifiziert und systematisch auf ihre Expression in 19 verschiedenen Geweben untersucht [Hsiao *et al.*, 2001]. Als Ergebnis zeigte sich eine teilweise sehr hohe Variabilität in ihrem Expressions-Niveau und ihrer Organspezifität [Warrington *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von 31 Haushaltsgenen normalisiert, die durch 111 verschiedene Elemente auf jedem Array repräsentiert waren. Diese Normalisierung basiert auf den von Chen *et al.* [1997] beschriebenen Algorithmen, die eine Verteilung der Intensitätsquotienten zweier normal verteilter Datensätze mit einer konstanten Varianz voraussetzen. In Verbindung mit empirisch ermittelten, System-orientierten Grenzwerten wurden reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Unter bioinformatischen Aspekten wäre es sehr interessant, die „Rohdaten“ mit verschiedenen mathematischen Methoden [Pietu *et al.*, 1996; Richmond *et al.*, 1999; Beissbarth *et al.*, 2000] erneut zu analysieren.

6.2 Vergleich von cDNS-Mikroarrays mit Nylonfilter-Arrays als Screeningmethode

Der Vergleich von cDNS-Mikroarrays mit konventionellen Nylonfilter-Arrays hat gezeigt, dass beide Methoden mit einer sehr ähnlichen Sensitivität verifiziert differenziell exprimierte Klone detektieren. cDNS-Mikroarrays haben bei einem differenziellen Expressions-Screening den Vorteil, dass sie eine parallele Analyse von sehr vielen Klonen in einer einzigen Hybridisierung ermöglichen [Skena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1997; Eisen *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1999; Alizadeh *et al.*, 2000]. Weiterhin können dort unterschiedlich markierte Targets in einer Hybridisierung kombiniert werden, wodurch für jedes Element eine inhärente Kontrolle vorhanden ist [Duggan *et al.*, 1999]. Im Gegensatz dazu erfordern konventionelle Nylon-Arrays zwei separate Hybridisierungen, was weitere Kontrollen erforderlich macht [Eickhoff *et al.*, 1999a; Beissbarth *et al.*, 2000; Schuchhardt *et al.*, 2000]. Ein weiterer deutlicher Vorteil der Mikroarrays liegt in dem geringen Hybridisierungsvolumen und der geringeren Target-Menge, die für ein Experiment benötigt werden. Dementsprechend kann mit dem gleichen Target eine größere Anzahl von parallelen Ansätzen durchgeführt werden, wodurch eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse erzielt wird [Lee *et al.*, 2000]. Die Verwendung von Mikroarrays zum Screening einer Subtraktionsbank hat neben der besonderen Leistungsfähigkeit die methodische Limitierung, dass Fragmente, die kürzer als 95 bp sind, nicht detektiert werden können [Yang *et al.*, 1999]. Dieser Nachteil zeigt sich bei der Verwendung von Nylon-Filtern nicht und sollte generell beim Screening einer Subtraktionsbank mit unbekanntem Klonen bedacht werden.

Die Verifikation der durch Mikroarray-Experimente erhaltenen Ergebnisse kann durch Northern Blot Analyse erfolgen [Skena *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999]. Ein quantitativer Vergleich von cDNS-Mikroarrays mit Northern Blots ergab, dass die Empfindlichkeit von Mikroarrays und Northern Blots vergleichbar ist [Welford *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Bartosiewicz *et al.*, 2000]. So zeigten zum Beispiel bei Mikroarray-Analysen 5 von 46 Genen (11%) einen Totalausfall oder eine signifikante Unterschätzung der Expression gegenüber der durch Northern Blot nachgewiesenen [Taniguchi *et al.*, 2001]. Demzufolge wurden 89% korrekt identifiziert. Virtuelle Northern Blots, die in der vorliegenden Arbeit aufgrund des geringen Ausgangsmaterials verwendet wurden, zeigten, dass 39 von 61 (64%) der differenziell exprimierten Gene korrekt identifiziert werden konnten. Diese geringere Trefferquote ist durch die hier angelegten, restriktiven Auswertungskriterien bedingt. Eine Verschiebung des „Cut-off“ Grenzwertes (siehe Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8) ergibt eine höhere Anzahl an korrekt identifizierten Klonen.

6.3 Differenzielles Screening der Subtraktionsbank

Mit dem Ziel globale Änderungen im Genexpressionsmuster in den Augen von ND-Knockout Mäusen zu untersuchen, wurde eine Augen-spezifische cDNS-Subtraktionsbank hergestellt. Dazu wurde Gesamt-RNS aus Augen einer zwei Jahre alten ND-Knockout Maus und eines gleichaltrigen Wildtyp Tieres verwendet. Durch die Orientierung der subtraktiv-suppressiven Hybridisierung (SSH) wurden Gentranskripte anreichert, die im Auge der ND-Knockout Maus fehlen oder eine geringere Abundanz im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Gleichzeitig wurden gleich stark exprimierte Gene reduziert. Zur Identifikation von Klonen, die differenziell exprimierte Sequenzen enthalten, wurden die initialen Subtraktionsprodukte für ein differenzielles Präscreening auf einen Mikroarray hybridisiert, der zusätzlich zu den ersten 96 gut charakterisierten Klonen weitere 3072 aus der cDNS-Subtraktionsbank enthielt. Zur Auswertung wurden dazu die bisher erlangten Erfahrungen und Parameter zur Identifikation differenzieller Klone auf den größeren Maßstab übertragen. Ein großer Anteil der Klone (1684 von 3072, 55%) detektierte differenziell exprimierte Transkripte, die eine Verringerung oder einen kompletten Verlust der Genexpression in den Augen von ND-Knockout Mäusen darstellten. Die Strategie des Redundanz-Screenings [Welford *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999] wurde an das vorliegende System adaptiert. Sie stellte eine sehr gute und effektive Möglichkeit zur Charakterisierung der Bank dar, wobei redundante Klone von der detaillierteren Analyse ausgeschlossen werden konnten.

Korrespondierend zu den Zahlen aus dem Redundanz-Screening konnte die Anzahl der in der Bank enthaltenen Gentranskripte ungefähr abgeschätzt werden. Die Hybridisierung gepoolter Kloninserts ergab eine Zahl von 228 unterschiedlichen Genen. Demgegenüber ergab die Hybridisierung von vollständigen cDNS nur 86. Die absolute Anzahl der Gene, die in den Augen von ND-Knockout Mäusen fehlen bzw. geringer exprimiert werden, kann allerdings wesentlich höher sein, da einige Transkripte nur durch einen einzigen Klon repräsentiert waren. Ferner beinhaltet diese Berechnung zwei der häufigsten Transkripte (Phosphodiesterase beta, *Pde6b*: 116 Elemente; Pigment der blausensitiven Zapfen, *Bcp*: 83 Elemente), wodurch die Aussage empfindlich verzerrt wird. In einer methodisch ähnlichen Arbeit [Welford *et al.*, 1998] wurde eine Kombination von RDA (*representational differences analysis*) und Mikroarrays zur Analyse von primärem Tumorgewebe verwendet. Dort zeigten 173 von 192 untersuchten cDNS-Klonen ein differenzielles Signal, 50 von ihnen enthielten eine unique Sequenz. Durch Hybridisierung dieser 50 Fragmente auf cDNS-Mikroarrays mit 1152 Elementen wurden 946 Signale erzeugt. Der Autor schätzt, dass 135 der 209 cDNS-Klone, die kein Signal gaben, neue Sequenzen enthalten. Im Gegensatz zu diesen Abschätzungen, ergab das Mikroarray-basierte Screening von 322 Klonen einer

Subtraktionsbank (ER-positive vs. ER-negative Brustkrebszelllinie) 10 Signale, die eine Überexpression in ER-positiven Zellen zeigen [Yang *et al.*, 1999]. Bernstein *et al.* [1996] hat eine cDNS-Bank der humanen Retina hergestellt, welche die differenzielle Genexpression in der Fovea reflektiert. Die Sequenzanalyse von 209 zufällig aus 20.000 ausgewählten Klonen, zeigte eine Übereinstimmung zu 121 bekannten und 88 unbekanntem Genen nach Datenbankanalyse. Zur Abschätzung der Redundanz wird in der Arbeit von Bernstein *et al.* [1996] leider keine Aussage gemacht.

6.4 Optimierung für Expressionsanalysen mit limitiertem Ausgangsmaterial

Um Mikroarray-basierte Expressionsanalysen mit RNS durchzuführen, müssen fluoreszenzmarkierte Targets von hoher Qualität hergestellt werden. Da aus dem Auge einer Maus nur etwa 10 µg Gesamt-RNS isoliert werden können, ist diese limitierte RNS - gerade wenn sie aus zwei Jahre alten ND-Knockout Mäusen stammt – besonders wertvoll. Neben der reproduzierbaren und effizienten Markierung von wenigen Mikrogramm Gesamt-RNS, ist es von substanzieller Bedeutung, dass die Markierung keine Verzerrung der Transkriptmengen verursacht. Durch den gewählten Ansatz, RNS aus einer Quelle in zwei Aliquots zu teilen, separat zu markieren und anschließend auf einem Mikroarray zu kohybridisieren, ist eine experimentell verursachte Verzerrung direkt zu erkennen [Schena *et al.*, 2000; Stears *et al.*, 2000]. In einem umfangreichen Methodenvergleich wurden nicht-amplifikative (direkte und indirekte Markierung) und amplifikative Verfahren (RNS-, cDNS- und Signalamplifikation) gegenübergestellt.

Von den nicht-amplikativen Verfahren zeigten gegenüber den direkt markierten Targets, Aminoallyl-modifizierte cDNS und indirekt mit Dendrimeren markierte Targets die stärksten Signale bei Aufrechterhaltung der initialen Transkript-Verhältnisse. Durch die direkte Inkorporation fluoreszenzmarkierter Nukleotide kam es dagegen zu einer Verzerrung. Verschiedene Ursachen könnten der Grund dafür sein. Einerseits lag die eingesetzte Menge an Gesamt-RNS (25µg) unter der minimal erforderlichen (50 µg) [Schena *et al.*, 1996]. Andererseits kommt eine Beeinträchtigung der Reversen Transkriptase durch die sterischen Eigenschaften der verhältnismäßig großen Fluorochrome in Frage [Wiegant *et al.*, 1996]. Diese experimentell verursachten Markierungsartefakte können durch einen Farbtasch identifiziert und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Da die Menge der eingebauten fluoreszenzmarkierten dNTPs bei der direkten Markierung sequenzabhängig ist [Zhu *et al.*, 1994], kann die hybridisierte cDNS nicht aufgrund der Fluoreszenz-Intensität des Signals

quantifiziert werden. Weiterhin resultieren sehr hohe Farbstoff-Einbauraten (>1 Farbstoffmolekül/20 Nukleotide) in einem signifikant verminderten Hybridisierungs-Signal, verglichen mit einem Target, mit geringerer Einbaurate [Randolph *et al.*, 1997; Worley *et al.*, 2000]. Aufgrund der starken Hydrophobizität der Fluorochrom-modifizierten Nukleotide [Randolph *et al.*, 1997] kann eine Aggregation der Targets auftreten, wodurch die Hybridisierung zusätzlich beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu zeigte die Verwendung von Aminoallylen [Nimmakayalu *et al.*, 2000] zur Markierung von 2 μg bakterieller RNS bessere Ergebnisse als der direkte Einbau fluoreszenter dNTPs und lieferte eine 10fach höhere Inkorporationsrate bei einer höheren spezifischen Aktivität [Schroeder *et al.*, 2002]. Die Verwendung von Dendrimer-Komplexen [Nilsen *et al.*, 1997] ermöglicht eine sehr hohe Reproduzierbarkeit bei einer 50fach geringeren Ausgangsmenge an RNS [Stears *et al.*, 2000]. Aufgrund der exakt quantifizierten Fluoreszenz-Intensität eines Dendrimers und durch die Tatsache, dass jedes cDNS-Transkript genau ein einzelnes Dendrimer bindet, ist das generierte Signal direkt proportional zur Anzahl der hybridisierten cDNS-Moleküle [Stears *et al.*, 2000].

Von den amplifikativen Verfahren lieferte die T7-Amplifikation überraschenderweise keine ausreichenden Ergebnisse. Die Methode der *in vitro* Transkription, bei der RNS linear amplifiziert wird [Van Gelder *et al.*, 1990], wurde ursprünglich zur funktionellen Analyse einzelner humaner Zellen genutzt [Eberwine *et al.*, 1992]. Methodische Modifikationen verbesserten die Sensitivität und ermöglichten Mikroarray-basierte Analysen [Lockhart *et al.*, 1996], wodurch Expressionsanalysen mit nur 500 Neuronen möglich waren [Luo *et al.*, 1999; Salunga *et al.*, 1999]. Eine zusätzliche methodische Abwandlung nutzt den Mechanismus der SMART-Technologie [Wang *et al.*, 2000], wodurch wesentlich längere cRNS-Moleküle generiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Targets durch die lineare Amplifikation zwar stark vermehrt, jedoch gingen die initialen Transkript-Verhältnisse verloren. Demgegenüber zeigten die Targets, die durch die PCR-basierte cDNS-Amplifikation mittels SMART-Technologie sehr stark vervielfältigt wurden, fast keine Verzerrung. Von dem besonderen Potential SMART-amplifizierter Targets für Expressionsanalysen wurde ebenfalls in der Literatur berichtet [Herrler, 2000; Vernon *et al.*, 2000]. Dort wurde auch gezeigt, dass nahezu alle differenziell exprimierten Gene, die mit Poly(A)⁺-RNS detektiert wurden, ebenso mit SMART-Targets nachgewiesen werden konnten [Vernon *et al.*, 2000]. Nachteilig bei der SMART-Amplifikation ist allerdings der verhältnismäßig hohe Arbeitsaufwand, da vorab die optimale Anzahl der PCR-Zyklen genau zu ermitteln ist und viele Kontrollschritte notwendig sind. Eine gänzlich andere Methode liegt der Signalamplifikation mit dem Tyramid-System (TSA) zugrunde, die zwei verschiedene

Detektionssysteme vereint. Dieses System erzeugt sehr starke Signale, von denen nur 3% falsch positiv waren. Das stimmt sehr gut mit publizierten Ergebnissen überein, wo der Vergleich von RNS aus einer Quelle für 5% der Elemente eine bis zu 3fache Abweichung lieferte [Adler *et al.*, 2000]. Aufgrund der erzeugten Signalintensitäten wird eine nicht-lineare Normalisierungsmethode empfohlen [Adler *et al.*, 2000; Karsten *et al.*, 2002]. Obwohl die TSA-Methode als sehr konsistent und reproduzierbar bezeichnet wird, besteht die Notwendigkeit eines Farbttausches [Karsten *et al.*, 2002] und die Forderung nach Verwendung separater Mikroarrays [Stephan *et al.*, 2000]. Zu diesen methodischen Limitierungen kommt die Eigenart der erzeugten Signale (siehe Abbildung 5.16), die zudem eine besondere Herausforderung an die Bildauswertung stellen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass ein vorheriger Methodenvergleich erforderlich ist, um das optimale Verfahren für die jeweilige Fragestellung zu finden. In der vorliegenden Arbeit zeigten das Dendrimer-System und die SMART-Technik die besten Ergebnisse bei einer äußerst geringen experimentellen Verzerrung der Transkript-Verhältnisse.

6.5 Komplexität und Anreicherung der Targets

Der Methodenvergleich und die Beurteilung hinsichtlich der Aufrechterhaltung der ursprünglichen Transkript-Verhältnisse, der Reproduzierbarkeit und der Signalstärke war eine Grundvoraussetzung für die Analyse der Genexpression. Drei Targets mit unterschiedlicher Komplexität wurden in einem Vergleichsexperiment auf ihr Potential hin untersucht, bekannte, differenziell exprimierte Gene zu detektieren. Das Ausgangsmaterial – RNS aus Augen von zwei Jahre alten Mäusen (ND-Knockout und Wildtyp) – wurde dafür entweder indirekt markiert, amplifiziert oder als Subtraktionsprodukt eingesetzt.

Eine vollständige Erfassung des Expressionsmusters unter Verwendung nicht amplifizierter RNS ist durch die ungleichen Häufigkeiten limitiert, mit denen Transkripte in einer Zelle vorliegen. Etwa die Hälfte der gesamten zellulären mRNS-Menge entspricht wenigen (ca. 300 – 800 verschiedenen) aber extrem häufig vorhandenen Transkripten (500 bis 12.000 Kopien/Zelle), die insgesamt 1% aller exprimierten Transkripte darstellen [Axel *et al.*, 1976]. Die andere Hälfte der mRNS-Masse einer Zelle entfällt auf die restlichen 99 % der verschiedenen Transkripte einer Zelle, das sind überwiegend schwach exprimierte mRNS¹ (15-500 Kopien/Zelle) [Axel *et al.*, 1976]. Gleichzeitig transkribiert werden etwa 8.000 bis 15.000 [Zhang *et al.*, 1997] der vermuteten 26-38.000 Gene [Venter *et al.*, 2001]. Durch RNS,

¹ mRNS können in fünf verschiedene Abundanz-Level (Kopien/Zelle) unterteilt werden: gering abundant: ≤ 5 ; gering bis mittel: ≤ 10 ; mittel: ≤ 50 ; mittel bis hoch: ≤ 100 ; hoch: > 100 [Warrington *et al.*, 2000].

die mit der Dendrimer-Technik markiert wurde, konnten 22% der differenziell exprimierten Elemente detektiert werden. Gegenüber nicht amplifizierter RNS bietet die SMART-cDNS Amplifikation den Vorteil, dass seltene Transkripte ohne Verzerrung vermehrt werden und in den Bereich der Nachweisgrenze kommen. Das spiegelt sich in den Ergebnissen wider, wo durch SMART-Targets 51% der differenziellen Elemente detektiert wurden.

In einer cDNS-Subtraktion (SSH) wird die Sequenzkomplexität in mehreren, aufeinander folgenden Schritten erheblich verringert, gleichzeitig werden differenziell exprimierte Sequenzen selektiv amplifiziert und bis auf das 1000fache angereichert [Diatchenko *et al.*, 1999]. Eine starke Anreicherung hinsichtlich gering abundanter, differenziell exprimierter Transkripte konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, da nahezu alle (96%) der verifiziert differenziellen Klone auf dem Mikroarray ein stark differenzielles Signal zeigten. Eine Identifikation von selten vorkommenden, differenziell exprimierten Transkripten durch subtraktiv-suppressive Hybridisierung wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt [Gurskaya *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999; Tchernitsa *et al.*, 1999]. Hochabundante Sequenzen, die in beiden Ausgangspopulationen vorkommen und nicht abgereichert werden können, machen den Hintergrund der Subtraktion aus [Diatchenko *et al.*, 1999]. Durch Klone, die im differenziellen Präscreening mit beiden Subtraktionsprodukten ein Signal erzeugen, konnte deren Anteil abgeschätzt werden.

Letztendlich läßt sich sagen, dass durch die Verwendung von Subtraktionsprodukten zur Mikroarray-basierten Expressionsanalyse gering abundante, differenzielle Gene detektiert werden konnten, die durch RNS- oder SMART-amplifizierte Targets nicht nachweisbar waren. Eine Subtraktion stellt jedoch auch einen hohen experimentellen Aufwand dar, und es bleibt zu prüfen, ob nicht der signifikant erhöhte Informationsgewinn eines SMART-Targets hinreichend ist.

6.6 Analyse der Genexpression in ND-Mäusen

Ziel der Expressionsanalysen war es, einen Einblick in die Pathogenesemechanismen während der Krankheitsprogression der Norrie Krankheit auf molekularer Ebene zu gewinnen. Bisher erfasste Expressionsdaten basieren auf der Analyse von Augenmaterial zwei Jahre alter ND-Mäuse und reflektieren daher das Endstadium. Durch die Verlaufsstudie wurden zeitliche Änderungen in der Genexpression erfasst, die Rückschlüsse auf mögliche pathogenetische Einflüsse erlauben.

6.6.1 Identität der differenziell exprimierten Gene

Obwohl RNS zur cDNS-Subtraktion verwendet wurde, die aus ganzen Augen isoliert worden war, sind viele der differenziell exprimierten Gene Retina-spezifisch. Da krankheitsassoziierte Veränderungen in der ND-Maus am auffälligsten in den retinalen Zellen manifestiert sind und die Expression des Norrie-Gens dort am stärksten ist [Berger *et al.*, 1996], zeigt dessen Fehlen dort auch die stärksten Auswirkungen. Histologische Untersuchungen an Augen zwei Jahre alter ND-Mäuse (nicht veröffentlichte Daten von S. Lenzner) zeigten, dass alle retinalen Schichten zwar drastisch reduziert, jedoch immer noch vorhanden sind. Durch den Verlust der zellulären Strukturen könnte ein Fehlen verschiedener Photorezeptor-spezifischer Gentranskripte erklärt werden.

Durch Sequenzanalyse von 236 cDNS-Fragmenten, die differenziell exprimierte Transkripte repräsentieren, wurde eine große Anzahl bekannter und über 50 neuer Gene identifiziert. Zu den bekannten Genen gehören zahlreiche Komponenten der Phototransduktionskaskade (Rhodopsin, *Rho*; Transduzin, *Gnat1* und *Gnat2*; zwei Phosphodiesterase-Untereinheiten, *Pde6b* und *Pde6g*; cGMP-kontrollierter Kationen Kanal, *Cncg*; Guanylat-Zyklase aktivierendes Protein, *Guca1a*; Arrestin, *Sag*) und Struktur-Proteine der Photorezeptorzellen. Mutationen in den humanen Orthologen dieser Transkripte sind häufig in familiären Formen von Netzhauterkrankungen involviert, wobei Mutationen in Enzym-kodierenden Genen sehr unterschiedliche Photorezeptor-Degenerationen verursachen. Weiterhin wurden Gene identifiziert, die in Kalzium-Bindung, Signaltransduktion und Exozytose involviert sind, ebenso wie RNS-bindende und Apoptose-inhibierende Proteine und solche für das Zytoskelett. Die Ergebnisse der Sequenz-basierten Genidentifikation sind im Anhang 11.5 zusammengefasst. Aufgrund des Potentials an möglichen Genen, die in dieser Bank enthalten sein können, sollen zukünftig alle 3072 Klone sequenziert werden.

Um die Frage zu klären, ob es auch Gene gibt, die in der ND-Knockout Maus im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert sind, wurde eine Subtraktion mit der entgegengesetzten Orientierung (5/16-SSH) durchgeführt (Tester: ND-Knockout). Die Analyse dieser Bank ergab, dass nur sehr wenige Gene in den Augen von ND-Knockout Mäusen stärker exprimiert waren. Nur ein Klon von 38 konnte auf einem Virtuellen Northern Blot bestätigt werden, wobei die Identität des korrespondierenden Gens bis heute noch völlig ungeklärt ist. Demzufolge kann angenommen werden, dass entweder sehr wenige Gene durch das Fehlen des Norrie-Genproduktes stärker als im Wildtyp exprimiert werden oder dass sie durch die angewandte Methode nicht detektiert werden können. Da 37 von 38 Klonen nicht differenziell exprimiert waren, liegt ein hoher Hintergrund bei dieser Subtraktion vor; d.h. es kommen in

beiden Populationen hoch exprimierte nicht differenzielle Transkripte vor, die nicht abgereichert werden können [Diatchenko *et al.*, 1999]. Die stichprobenartige Analyse solcher Klone hat ein starkes Vorhandensein mitochondrialer Gentranskripte gezeigt, was durch die hohe oxidative und phosphorylative Stoffwechselaktivität der Netzhaut erklärt werden kann [Liew *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1995].

6.6.2 Analyse der Genexpression basierend auf Einzeltieren

Für die experimentelle Durchführung der Zeitverlaufsstudie wurden 21 Tierpaare verschiedener Altersstadien (jeweils 3 Tierpaare im Alter von 0,5 bis 24 Monaten) und über 50 cDNS-Mikroarrays eingesetzt. Einerseits sichert eine Vielzahl von Wiederholungsexperimenten die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Aussagen [Lee *et al.*, 2000] und andererseits werden insbesondere individuelle, biologische Eigenschaften verschiedener Einzeltiere berücksichtigt. Bei Pritchard *et al.* [2001] wurde die normale Variation der murinen Genexpression mit cDNS-Mikroarrays untersucht, wobei sich zum Beispiel für Nierengewebe von gesunden, erwachsenen C57Bl/6-Mäusen eine Variation von 3,3% (102 von 3088 Genen) zeigte. Durch die Untersuchung von Einzeltierpaaren konnte in der vorliegenden Arbeit eine hohe biologische Variation festgestellt werden, die sich besonders stark bei den 18 Monate alten ND-Mäusen manifestierte. Zwei Tiere zeigten äußerst geringe Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu den beiden anderen gleichaltrigen. Das variable Einsetzen pathologischer Anzeichen wurde für die ND-Maus bisher nicht beschrieben und ist völlig neu. Dahingegen wurden bei Patienten, die die gleiche Mutation im Norrie-Gen aufweisen, Variationen im Augenphänotyp schon früher beschrieben [Zaremba *et al.*, 1998]. Das unterstreicht die Schwierigkeit einer genauen Voraussage des Krankheitsbildes aufgrund einer bekannten Mutation [Schuback *et al.*, 1995]. Weitere genetische oder umweltabhängige Faktoren können daher für den Verlauf der Pathogenese von Bedeutung sein.

6.6.3 Änderung der Genexpression während der Krankheitsprogression

Obwohl die Subtraktionsbank von zwei Jahre alten Mäusen etabliert wurde, ergaben die Expressionsstudien, dass die darin enthaltenen Gene auch frühe Veränderungen und nicht nur das Endstadium der Norrie Krankheit reflektieren. Jedoch ist es nicht möglich, die primäre Änderung der Genexpression als sofortige oder frühe Antwort auf den ND-Gendefekt zu erfassen, sondern vielmehr diejenigen Gene, die in Folge der Krankheitsprogression differenziell exprimiert werden (Sekundäreffekte). Ein Mangel spezifischer mRNS

Transkripte in den Augen der ND-Maus kann entweder durch den kompletten, krankheitsassoziierten Verlust bestimmter Zell-Typen erklärt werden oder durch die verminderte Fähigkeit dieser Zellen, das charakteristische Set an Genen zu exprimieren. Dies wird besonders deutlich, wenn die Expression von einzelnen Genen im zeitlichen Verlauf betrachtet wird. Im frühen Stadium der Norrie-Krankheit zeigen einige der Photorezeptor-spezifischen Gen-Transkripte bereits eine einsetzende Verringerung der Transkript-Zahl. Im weiteren Verlauf weisen Gene, die für Komponenten des Zytoskeletts und für Struktur Proteine kodieren, eine Reduktion im Expressions-Niveau auf. Im Endstadium konnten Änderungen in Genen, die in Verbindung mit apoptotischen Prozessen stehen, detektiert werden.

Nach vier bis 12 Wochen setzt eine verminderte Expression Photorezeptor-spezifischer Transkripte (*Pdeb*, *Bcp*, *Pdc* und *Sag*) ein. Mutationen im Gen, das für die cGMP Phosphodiesterase beta (*Pdeb*) kodiert, sind mit verschiedenen Phänotypen assoziiert [Farber, 1995]; der autosomal-rezessiven Form der Retinitis Pigmentosa (RP), einer degenerativen Erkrankung der Photorezeptoren [McLaughlin *et al.*, 1993] und der autosomal-dominanten stationären Nachtblindheit (CSNB) [Gal *et al.*, 1994]. Substitutions-Mutationen im Gen, das für das blaue Zapfenpigment (*Bcp*) kodiert, führen zur autosomal-dominanten Tritanopie, der Blaublindheit [Went *et al.*, 1985]. Im Unterschied zur Rot- und Grünblindheit, die rezessiv vererbt werden, zeigen aberante Genprodukte bei der Blaublindheit eine aktive Interferenz mit der Beständigkeit oder Funktionalität (oder beides) von Blau-sensitiven Zapfen [Weitz *et al.*, 1992]. Das frühzeitige Fehlen dieses Transkripts könnte ein erster Hinweis dafür sein, dass einige zelluläre Strukturen, insbesondere im fovealen Bereich der Netzhaut, sehr früh im Krankheitsprozess betroffen sind. Phosduzin (*Pdc*) ist ein ubiquitärer G-Protein Regulator [Danner *et al.*, 1996]. Es moduliert durch Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein Transduzin die Lichtempfindlichkeit in den äußeren Segmenten der Stäbchen (ROS) [Lee *et al.*, 1992; Abe *et al.*, 1994], ist selbst aber vorwiegend in den inneren Segmenten (RIS) lokalisiert [Nakano *et al.*, 2001]. Mutationen in dem Gen, das für Phosduzin kodiert, sind mit der milden Form des autosomal-rezessiven Usher-Syndroms Typ II (*Ush2*) verbunden [Ara-Iwata *et al.*, 1996], die mit einem moderaten sensorineuralen Gehörverlust und einer progressiven RP einhergeht [Eudy *et al.*, 1998]. Sensorineurale Taubheit wurde ebenso bei einem Drittel der Norrie-Patienten beobachtet [Warburg, 1966] und könnte möglicherweise ursächlich mit einer verminderten Expression von Phosduzin zusammenhängen. Arrestin (*Sag*) bindet an Opsin [Puig *et al.*, 1995] und verhindert dadurch eine weitere Transduzin-Opisin Bindung. Nullmutationen der Rhodopsin-Kinase [Yamamoto *et al.*, 1997] und Arrestin

[Fuchs *et al.*, 1995] sind mit der Oguchi Krankheit, einer Form der autosomal-rezessiven stationären Nachtblindheit, assoziiert.

Insgesamt könnte der Verlust Photorezeptor-spezifischer Gentranskripte mit den bei Berger *et al.* [1996] beschriebenen fokal betroffenen Gebieten (äußere Plexiforme Schicht und Außensegmente) korreliert sein. Möglicherweise werden die wenigen betroffenen Zellen mit einer stark reduzierten oder fehlenden Genexpression, durch die große Mehrheit intakter Zellen mit normalem Expressionsmuster maskiert. Eine prinzipiell ähnliche Hypothese wird bei Sandberg *et al.* [2000] für sehr kleine, scharf umgrenzte Areale eines Mausgehirns aufgestellt. Dort würden weitaus stärkere Expressionsunterschiede erwartet, wenn es gelänge, die betroffenen Bereiche besser zu präparieren [Geschwind, 2000; Sandberg *et al.*, 2000]. Für den Verlauf der Norrie-Krankheit würde diese Hypothese bedeuten, dass sich die zunächst kleinen Areale im Verlauf der Krankheit ausweiten.

Nach 12 Monaten, mit fortschreitender Krankheitsprogression, zeigen Gene, die für Komponenten des Zytoskeletts und Strukturproteine der Photorezeptoren kodieren (Peripherin, *Prph2/Rds*; äußeres Membran-Protein der Stäbchen, *Rom1*; Retinoschisin, *Xlrs1*; Keratin Komplex 1, *Krtl-13*) eine drastische Reduktion der Genexpression. Peripherin (*Prph2/Rds*) ist ein häufig vorkommendes Transmembran-Protein, das eine intakte Struktur der Photorezeptoren mit gewährleistet. Es ist in den Membranen der Außensegmente von Zapfen und Stäbchen lokalisiert und verankert die Disks mit dem Zytoskelett der Zelle [Travis *et al.*, 1991]. Ein Fehlen des Proteins wird mit retinaler Dystrophie assoziiert [Farrar *et al.*, 1991; Wells *et al.*, 1993]. Ein anderes Struktur-Protein ist *Rom1*, das äußere Membran-Protein der Stäbchen, es bildet mit Peripherin Tetramere und stellt eine wichtige strukturelle Komponente der Außensegmente dar. Peripherin-Sequenzvarianten stehen in Verbindung mit einer Vielzahl autosomal-rezessiver Phänotypen, wie zum Beispiel der RP, der Makuladystrophie und der Zapfen-Stäbchen Dystrophie [Kemp *et al.*, 1994]. Die verminderte Expression dieser beiden Gene könnte bedeuten, dass die strukturelle Integrität der Zapfen und Stäbchen zu Beginn nur leicht und lokal begrenzt, später in der Krankheitsprogression aber deutlich beeinträchtigt wird. Diese Annahme stimmt mit ERG²-Studien an sieben bis 12 Monate alten ND-Mäusen überein, wo es vorwiegend zu einem Verlust innerer retinaler Komponenten kam, während äußere Schichten nur geringfügig beeinträchtigt waren [Ruether *et al.*, 1997]. Bei Ruether *et al.* [1997] wird auch von retinoschisisartigen Veränderungen in

² Elektroretinographie; Abk. ERG; Ableitung u. Registrierung der vom Auge nach Belichtung abgeleiteten Potentialdifferenzen; die zwischen Hornhaut und indifferenter Schläfenelektrode registrierten Potentialschwankungen zeigen nach Lichtreiz einen typischen mehrphasigen Kurvenverlauf.

der ND-Maus berichtet, wobei die hypothetische Annahme geäußert wurde, dass derartige Veränderungen beim Patienten zu einem besonders schweren Verlauf der Norrie-Krankheit beitragen könnten. In dieser Hinsicht ist auch die Expression von *Xlrs1* interessant, die nach 12 Monaten stark reduziert ist. Mutationen in *Xlrs1* führen zu einer häufig vorkommenden Form der Makuladegeneration, der X-chromosomalen Retinoschisis [Sauer *et al.*, 1997]. *Xlrs1* wird in den Bipolarzellen und den Photorezeptoren exprimiert [Reid *et al.*, 1999; Grayson *et al.*, 2000; Molday *et al.*, 2001]. Aufgrund der späten Involvierung der äußeren retinalen Schichten und den Ergebnissen der ERG-Studien von Ruether *et al.* [1997], kann vermutet werden, dass zuerst das Transkript der Bipolar-Zellen und nachfolgend die Photorezeptor-Variante verloren geht. Diese Hypothese könnte durch RNS *in situ* Hybridisierungen betroffener ND-Mäuse nachgewiesen werden.

Nach 24 Monaten zeigen Gene, die im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen stehen, (Bcl-2 bindendes Protein, *Bis* und das Fas Apoptose-inhibierende Molekül, *Faim*) in den ND-Knockout Mäusen eine drastische Reduktion in der Expression. Beide Gene kodieren für Proteine, die als negative Regulatoren der Apoptose wirken. Wobei *Bis* nur eine geringe anti-apoptotische Aktivität besitzt, aber verstärkend auf die Bcl-2 vermittelte Abschwächung der Apoptose einwirkt [Lee *et al.*, 1999]. Ektopische Expression von Bcl-2 in Photorezeptorzellen von Mäusen, die eine Mutation im Peripherin-Gen haben, schützt die Photorezeptoren vor dem Zelltod [Nir *et al.*, 2000]. Weiterhin bewahrt die Überexpression von Bcl-2 kultivierte Photorezeptorzellen vor der Apoptose, die durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht induziert wurde [Crawford *et al.*, 2001]. In 2 Jahre alten ND-Mäusen fehlt zusätzlich die Expression von *Faim*. *Faim*, wurde ursprünglich bei der Analyse Fas-resistenter B-Lymphozyten isoliert, es wird in verschiedenen Geweben und Zell-Typen exprimiert und wirkt dort als induzierbarer Mediator der Fas-Resistenz [Schneider *et al.*, 1999]. Ein Verlust der anti-apoptotischen Funktion von *Bis* und *Faim* in ND-Knockouts kann zur progressiven Degeneration der Photorezeptorzellen beitragen.

Zum ersten Mal konnten molekular-pathologische Veränderungen in ND-Mäusen durch die Analyse des zeitlichen Verlaufs differenziell exprimierter Gene identifiziert werden. Die kontinuierliche Expression des ND-Gens hat eine wichtige Bedeutung für die Funktion und Integrität der retinalen Zell-Schichten, insbesondere für Photorezeptorzellen. Da das ND-Gen vorwiegend in den inneren Zell-Schichten der Retina erwachsener Mäuse exprimiert wird und die vollständige Photorezeptor-Degeneration relativ spät in ND-Mäusen eintritt, läßt sich folgern, dass der Effekt des ND-Proteins auf Zapfen und Stäbchen indirekt ist.

6.7 Ausblick

Die globale Analyse der Genexpression ausgehend von Augenmaterial von Norrie-Knockout Mäusen hat sehr viele differenzierte Aussagen über die Pathogenesemechanismen dieser Augenerkrankung ermöglicht. Eine Vielzahl der identifizierten, differenziell exprimierten Gene erforderte eine detaillierte Analyse, Charakterisierung und Bestätigung durch unabhängige Verfahren (RT-PCR, VNB). Für einen Teil der Gene wurde diese Arbeit bereits durchgeführt (S. Feil, S. Münscher). Von einigen, derzeit noch unbekannt Genen steht eine Charakterisierung noch aus. Dazu müssen mittels RACE-PCR die vollständigen cDNS hergestellt und anschließend durch Sequenz- und Datenbankanalyse untersucht werden.

Durch die Zeitverlaufsstudien wurden krankheitsassoziierte Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene detektiert. Einige der korrespondierenden Gene konnten von S. Lenzner sowohl in ihrer differenziellen Expression als auch in der zeitlichen Änderung ihrer Expressionsstärke auf *Multiple-Stage Northern Blots* verifiziert werden. Gene mit besonderer funktioneller Relevanz (z.B. *Xlrs*) werden von ihm in nächster Zukunft auf histologischen Schnittpräparaten von Augen betroffener Mäuse durch RNS *in situ* Hybridisierung getestet.

Primäre pathogenetische Veränderungen der Norrie Krankheit konnten in dieser Arbeit durch den gewählten Ansatz nicht untersucht werden. Daher hat U. Luhmann in seiner Arbeit Subtraktionsbanken von jüngeren Altersstadien angefertigt, wodurch insbesondere die frühe Antwort auf den ND-Gendefekt gefunden werden soll. Die generierten cDNS-Klone wurden mit der hier entwickelten Strategie des differenziellen Präscreenings analysiert. Bisher zeigte sich jedoch ein unerwartet hoher Hintergrund der Subtraktion, sodass die Einzelanalyse der Klone auf VNBs nur sehr wenige Gene in ihrer differenziellen Expression bestätigte.

Die Mikroarray-Analysen der vorliegenden Arbeit wurden mit cDNS-Klonen einer Subtraktionsbank durchgeführt, deren Identität zu Beginn nicht mal ansatzweise bekannt war. Durch die sukzessive Sequenzanalyse - zuerst von besonders interessanten, differenziellen Klonen, später von allen – wurde und wird der Informationsgehalt der gewonnenen Expressionsdaten ständig vergrößert. Zudem ist es in der nahen Zukunft angestrebt, die verwendeten UniGene-Klone aus dem RZPD komplett zu sequenzieren. Die Tatsache, dass sämtliche Klone während allen durchgeführten Experimenten auf den Mikroarrays durch PCR-Produkte repräsentiert waren, verdeutlicht, welches enorme Informationspotential für zukünftige Analysen in den generierten Datensätzen enthalten ist. Unter bioinformatischem Aspekt stellen die umfangreichen Datensätze ebenso eine besonders wertvolle Quelle dar. Verschiedene Algorithmen zur Identifikation differenziell exprimierter Gene können damit

getestet werden – die verifiziert differenziellen Elemente stellen hierbei eine Art Positivkontrolle dar.

Potenziell wertvoll sind nicht nur die generierten Datensätze, sondern auch die hergestellten cDNS-Mikroarrays mit den darauf enthaltenen Genen, die für Komponenten der Phototransduktionskaskade, des Zytoskeletts und Strukturproteine kodieren. In Verbindung mit sensitivien Verfahren der Fluoreszenzmarkierung finden diese Mikroarrays bei der Expressionsanalyse von anderen Mausmodellen mit degenerativen Netzhautveränderungen eine Anwendung. In ersten Pilotexperimenten wurden bereits drei völlig unterschiedliche Modelle auf differenziell exprimierte Gene hin gescreent: eine RP-Knockout Maus, eine natürliche Mutante mit einem Defekt in den Ribbon-Synapsen und eine Maus, bei der durch hohe Lichtintensitäten Apoptose induziert wurde. Die durch dieses Screening erzielten umfangreichen Ergebnisse und Datensätze müssen demnächst noch im Detail ausgewertet und verifiziert werden. In diesem Ansatz zeigt sich bereits die besondere Leistungsfähigkeit der Technologie. Daher ist es für zukünftige Anwendungen und Fragestellungen gut denkbar, die Mikroarrays unter Verwendung geeigneter Mausmodelle in der pharmakologischen Forschung zur Entwicklung relevanter Therapiekonzepte und deren Kontrolle einzusetzen.