

Nachweis genomischer Imbalancen mittels DNA-Microarrays mit Ziel- Sequenzen unterschiedlicher Komplexität

Diplomarbeit

vorgelegt
der Fakultät für Biologie
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Felix S. Kokocinski

2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg in der Abteilung *Organisation komplexer Genome* unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Buselmaier vom Institut für Humangenetik und PD Dr. P. Lichter vom DKFZ in der Zeit vom 16.02.2000 bis zum 14.10.2000 angefertigt.

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig unter Anleitung verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Felix S. Kokocinski

Heidelberg, den 15.10.2000

Referent: Prof. Dr. Werner Buselmaier
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät
Institut für Humangenetik

Koreferent: PD Dr. Peter Lichter
Deutsche Krebsforschungszentrum Heidelberg
Abteilung Organisation komplexer Genome

*Meinen Eltern
für Leiten und Lassen*

An dieser Stelle möchte ich einen großen Dank für die empfangene Unterstützung im harten Forscher-Alltag aussprechen, insbesondere an meine Familie, an Peter Lichter und sein Team, hierbei v.a. an Gunnar, Michelle, Sandra und Sybille, Daniel und Stephan, an Herrn Prof. Buselmaier für die Übernahme des Referats, sowie in besonderem Maße an Anja und das *Never-Clone-Alone-Team*.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Genetische Veränderungen in Krebszellen	3
1.2. Detektion chromosomaler Imbalancen mit der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH)	4
1.3. DNA-Microarrays I: Matrix-CGH	7
1.4. DNA-Microarrays II: cDNA-Matrix-CGH	11
1.5. DNA-Microarrays III: Expressions-Analyse	13
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Chemikalien	15
2.1.2. Humane DNA	16
2.1.3. Geräte	18
2.1.4. Sonstiges	18
2.2. Methoden	19
2.2.1. Chromosomale CGH	19
2.2.1.1. Präparation menschlicher Metaphase-Chromosomen aus peripherem Blut	19
2.2.1.2. Markierung der Proben-DNA: Nick-Translation	19
2.2.1.3. Vorbereitung der Proben	21
2.2.1.4. Vorbereitung der Objektträger	21
2.2.1.5. Hybridisierung	22
2.2.1.6. Posthybridisierungs-Schritte	22
2.2.1.7. Detektion der hybridisierten DNA	22
2.2.1.8. Aufnahme und Auswertung der Signale	23
2.2.2. Matrix-CGH	24
2.2.2.1. Präparation der Ziel-DNA:	24
2.2.2.1.1. Isolierung von PAC-DNA aus E.coli-Bakterien	24
2.2.2.1.2. DNA-Konzentrations- und -Größenbestimmung durch Gelelektrophorese	25
2.2.2.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung durch spektroskopische Vermessung	26
2.2.2.1.4. Reverse Transkription von mRNA	26

2.2.2.1.5. cDNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion	27
2.2.2.1.6. Amplifikation von YAC-DNA mittels ALU-long range PCR	29
2.2.2.1.7. Aufreinigung der PCR-Produkte mittels PEG-8000	30
2.2.2.2. Markierung der Proben-DNA	30
2.2.2.3. Vorbereitung der Objektträger	32
2.2.2.4. Aufbringen der Ziel-DNA auf die Objektträger	32
2.2.2.5. Vorbereitung der Objektträger zur Hybridisierung	34
2.2.2.6. Aufkonzentration der Proben	34
2.2.2.7. Hybridisierung	35
2.2.2.8. Posthybridisierungs-Schritte	35
2.2.2.9. Messung der Signalintensitäten	36
2.2.2.10. Auswertung	36
2.2.3. Expressions-Hybridisierung	37
2.2.4. Sequenzierung	38
2.2.4.1. Markierung der DNA	39
2.2.4.2. Fällung / Konzentration der DNA	39
2.2.4.3. Vorbereitung der Sequenzier-Maschine und Gellauf	39
2.2.4.5. Auswertung	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Chromosomale CGH-Analyse der Zelllinie COLO-320	41
3.2. Sequenz-Überprüfung der cDNAs	45
3.3. Bestimmung experimenteller Parameter	48
3.3.1. Stabilität der Fluoreszenzsignale von Cy3 und Cy5	48
3.3.2. Morphologie der DNA-Spots	50
3.4. Herstellung der DNA-Microarrays	52
3.5. Analyse objektträgerspezifischer Unterschiede	57
3.6. Untersuchungen zur Signalintensität bei Hybridisierungen auf Microarrays	58
3.6.1. Methoden zur Markierung der Proben-DNA	58
3.6.2. Konzentration der Proben-DNA	60
3.6.3. Konzentration der Ziel-DNA	60
3.6.4. Komplexität der Ziel-DNA	64
3.7. Vergleich der Hybridisierungs-Ratios	69

3.8. Entwicklung eines Computer-Programms zur Auswertung von mCGH-Experimenten	73
3.9. Expressions-Hybridisierung	75
4. Diskussion	78
5. Zusammenfassung	86
6. Literaturverzeichnis	87
7. Anhang	93
7.1. Abkürzungen	93
7.2. Worterklärungen	94

1. Einleitung

Krebs ist nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. 24,3% aller Todesfälle sind auf bösartige Neubildungen zurückzuführen (Krebshilfe Deutschland). Betroffen sind dabei im Gegensatz zu den Kreislauferkrankungen oft auch Menschen jüngeren Alters. Es muß daher als eine der vordringlichsten Aufgaben der Medizin und der medizinischen Biologie angesehen werden, Ursachen der Krebsentstehung zu identifizieren und Therapien zu entwickeln.

Die Tumorgenese geht einher mit einer Anhäufung genetischer und epigenetischer Veränderungen in den betroffenen Zellen, in soliden Tumoren liegen teilweise bis zu 30% des Genoms in veränderten Kopienzahlen vor (Iwabuchi, H. et al. 1995). Die Unterscheidung von Bereichen zufälliger Sekundärmutationen und solchen, die für die Entartung der Zelle mitverantwortlich sind, ist für die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen entscheidend. Schrittweise können auf diesem Wege für die Tumorgenese wichtige Gene identifiziert werden, um dann ihre Funktion analysieren zu können.

Mit der fast vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms liegen uns nun a priori Informationen über die Abfolge der Basenbausteine der Nukleinsäuren, den „Erbmolekülen“, vor. Anhand dieser Informationen können teilweise bereits auf theoretischem Wege Funktionen und Interaktionen postuliert werden.

Eine Zusammenführung dieser experimentellen und theoretischen Ansätze ist fruchtbar, um schneller und präziser Zusammenhänge zwischen Krankheiten (Phänotyp) und zugrundeliegenden genetische Ursachen (Genotyp) bestimmen zu können. Darauf basierend sollte es verbesserte Möglichkeiten geben, Prädispositionen zu Krankheiten frühzeitig erkennen und individuelle Therapien entwickeln zu können.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in den letzten Jahren verstärkt Methoden entwickelt, die es ermöglichen, mit einem hohen Durchsatz die Analyse von Veränderungen im Genom durchzuführen (*large-scale high throughput screening methods*). Zu diesen Analysemethoden zählen unter anderen die *Vergleichende Genomisch Hybridisierung (CGH)* und die *Representational Difference Analysis (RDA)* zur Untersuchung genomischer Variationen einerseits und die *Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)* und das *Differential Display* als Methoden zur Analyse der Aktivität von einzelnen Genen (Expressionsstudien) andererseits (Übersicht: Gray, J.W & Collins, C. 2000).

Für die Analyse genetischer Unterschiede wird häufig die Eigenschaft der Nucleinsäuren genutzt, miteinander reversible Bindungen von in ihrer Basenabfolge komplementären Einzelstrangmolekülen eingehen zu können (*Hybridisierung*).

Auch die sogenannte DNA-Microarray-Technologie basiert auf Hybridisierungen zwischen unterschiedlichen Nucleinsäure-Fragmenten. Als DNA-Microarray oder DNA-Chip bezeichnet man einen miniaturisierten Träger mit einer meist aus Glas bestehende Oberfläche, auf die an definierten Positionen unterschiedliche Nucleinsäuren als Hybridisierungsziele aufgebracht und immobilisiert wurden. Im Experiment werden dann die sich in Lösung befindenden komplementären Nucleinsäure-Moleküle hinzugegeben. Diese werden zuvor mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, wodurch die Detektion einer erfolgten Hybridisierung bei der Auswertung ermöglicht wird. Diese Markierung läßt sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse zu. Durch die Entwicklung von DNA-Chips sind eine Reihe neuer Verfahren mit unterschiedlichen Zielsetzungen entstanden. Generell lassen sich drei Hauptanwendungsgebiete unterscheiden:

- Untersuchung von DNA-Sequenzveränderungen (Mutationen, Sequenzpolymorphismen; mit genomischer DNA als Untersuchungsobjekt)
- Untersuchung chromosomaler Imbalancen (mit genomischer DNA; Abschnitt 1.3 und 1.4.)
- Analyse der Genexpression (mit mRNA als Untersuchungsobjekt; Abschnitt 1.5.)

Die zugrundeliegende Idee, eine markierte *Probe* auf immobilisierte DNA (*Target*) zu hybridisieren geht auf Edwin Southern zurück, der daraus die sog. *Southern blot*-Technik entwickelte (Southern et al. 1975). Hybridisierungen finden in den traditionellen Experimenten auf flexiblen Membranen (z.B. aus Nitrozellulose) statt und nutzen radioaktiv markierte Proben als Sonde. Diese Art von Experimenten wird jetzt als Macroarray-Hybridisierung bezeichnet. Die ersten Hybridisierungsexperimente auf DNA-Microarrays wurden vor ca. 10 Jahren von Steve Fodor und seinen Mitarbeitern der californischen Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) und Patrick Brown und Kollegen an der Stanford Universität (Stanford, USA) durchgeführt (Pease, A.C. 1994, bzw. Shena et al. 1995). Hierbei entstanden parallel zwei unterschiedliche Methoden zur Entwicklung von DNA-Chips, die heute beide ihre Anwendung finden.

Die DNA-Chiptechnologie hat großes Potential sich als wichtige Methode, sowohl im Bereich der Grundlagenforschung, als auch in der klinischen Anwendung zu etablieren. Beispielsweise können Expressionanalysen von Zellpopulationen bisher nicht oder nur schlecht zugängliche Daten bezüglich Stoffwechselwege, Reaktionen auf Arzneimittel oder Umweltbedingungen u.ä. in großem Maßstab liefern.

Einige Vorteile der Technologie sind:

- Parallele Abfrage einer großen Anzahl von Zielstellen (DNA-Sequenzen) - evt. des gesamten Genoms
- Automatisierungsmöglichkeit der Chip-Produktion
- Teil-Automatisierung der Auswertung
- Verifizierbarkeit einzelner Daten mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden (*Southern-* und *Northern-Blot*)

1.1. Genetische Veränderungen in Krebszellen

Bei der Entstehung des Krankheitsbildes "Krebs" gehen genetische Veränderungen in somatischen Zellen der Tumorgenese voraus. Die Zelle entkommt der normalen Regulation, ungebremstes Wachstum kann zu klonaler Expansion und letztendlich zu einem Tumor führen. Die Regulation erfolgt in gesunden Zellen durch Gene, deren Produkte in komplexen Kontrollmechanismen wirken und Zellteilung initiieren können oder im Falle einer Mutation Reparaturmechanismen, bzw. den „programmierten Zelltod“ (Apoptose) einleiten. Diese Gene unterscheidet man in Tumorsuppressor-, (Proto-) Onko- und Mutatorgene.

Die Existenz von **Tumorsuppressorgenen** (TSG) wurde nach Untersuchungen mit Patienten postuliert, die an einem sogenannten Retinoblastom litten, einem seltenen, sporadisch oder familiär bereits in der Kindheit auftretenden Augentumor (Knudson 1971). Basierend auf seine Beobachtungen postulierte Alfred Knudson das „Zwei-Treffer-Modell“, welches besagt, daß zur Entstehung eines Tumors zwei einzelne Mutationsereignisse stattfinden müssen. Beide Allele eines Gens müssen verändert werden, sodaß kein funktionsfähiges „Tumor-Unterdrückungs-Produkt“ mehr gebildet werden kann (*loss-of-function-Mutation*). Im Falle des familiären Retinoblastoms wurde später das *Rb1*-Gen identifiziert, welches bei betroffenen Menschen bereits als verändertes Allel von einem Elternteil geerbt wird und dessen zweites Allel auf somatischer Einzelzell-Ebene mutiert.

Im Gegensatz zu den - auf die einzelne Zelle bezogen - rezessiven TSG, wirken **Onkogene** dominant: Eine einzelne Mutation reicht aus, um das zelluläre Gleichgewicht zu stören. Potentielle Onkogene (Proto-Onkogene) sind in der gesunden Zelle an wichtigen Mechanismen zur Regulation von Stoffwechsel und Zellproliferation beteiligt und selbst einem strengen Kontrollsystem unterworfen. Dieses System kann gestört werden, indem eine Translokation die Genfolge verändert, durch Amplifikation genetische

Bereiche vervielfältigt vorliegen oder eine Punktmutation ein Gen mit Kontrollfunktion inaktiviert. Ein Proto-Onkogen kann dann verstärkt aktiviert werden und treibt die Zelle als Onkogen in ungebremstes Wachstum und in die Tumorgenese (*gain-of-function-Mutation*). Dieses Modell wurde durch die Entdeckungen von Peyton Rous im Jahre 1911 eingeführt, der die Entstehung von Tumoren bei Vögeln durch das Einbringen eines Onkogen-homologen Gens aus dem Rous-Sarcoma-Virus in Zellen erklären konnte.

Ein bekannter Vertreter mit onkogenem Potential, der auch in dieser Arbeit Anwendung fand, ist das Gen *MYC*, welches als transformierendes Onkogen *v-MYC* in Viren und als homologes Proto-Onkogen *c-MYC* (und weiteren Homologen) im menschlichen Genom vorkommt. Das *myc*-Protein wirkt u.a. als Transkriptionsfaktor stimulierend auf die Zellproliferation. Beim *Burkitt-Lymphom* kommt es durch eine Translokation des Gens von Chromosom 8 in einen sehr aktiven Bereich des Chromosoms 14, der für die schwere Kette von Immunglobulinen codiert, zu einer Überexpression von *myc*.

Eine weitere Gruppe von Genen, die in die Karzinogenese involviert sind, werden als **Mutatorgene** bezeichnet. In gesunden Zellen haben sie die Aufgabe, die genetische Integrität zu bewahren. Informationen müssen stabil auf die nächste Zell-Generation weitergegeben werden, ein Vorgang, der in Zellen bei der Transformation zu Krebszellen verloren geht. Hier häufen sich Mutationen auf zwei verschiedenen Ebenen an: Entweder werden komplette Chromosomen oder größere Abschnitte vervielfacht (*Chromosomale Instabilität*, CIN), oder es kommt zu einer erhöhten Rate an Genmutationen (*Mikrosatelliten-Instabilität*, MIN). Mutatorgendefekte erleichtern die Transformation von Zellen durch gehäufte Mutationsereignisse, da sie z.B. für DNA-Reparaturmechanismen mitverantwortlich sind.

1.2. Detektion chromosomaler Imbalancen mit der *Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH)*

Die Charakterisierung von Veränderungen der Anzahl vorhandener Chromosomen oder chromosomaler Regionen, welche bei vielen genetisch bedingten Krankheiten des Menschen eine wichtige Rolle spielen, ist entscheidend für die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Kritische Bereiche im Genom können eingegrenzt, Zusammenhänge definierter Abberationen und bestimmter Phänotypen aufgedeckt und eine differenziertere Diagnose durchgeführt werden.

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization, CGH*) wurde zur Analyse von Kopienzahlveränderungen chromosomaler Bereiche in Tumorzellen entwickelt (Kallioniemi et al. 1992). Sie basiert auf der Methode der *Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)*, bei der eine markierte DNA-Probe eines definierten chromosomalen Locus auf Zellkerne, bzw. Metaphase-Chromosomen eines Patienten zur Identifikation von Abberationen hybridisiert wird. Im Gegensatz dazu sind für die CGH-Methode keine Metaphase-Zellen des Patienten nötig. Oftmals sind gerade diese Zellen von Tumoren nicht oder nur in zu geringer Qualität verfügbar. Die CGH nutzt als Probe Gesamt-DNA des Tumorgewebes in einer Hybridisierung auf gespreitete Metaphase-Chromosomen gesunder Zellen. Es findet hierbei eine Ko-Hybridisierung mit DNA aus Referenzzellen statt. Die einander entsprechenden DNA-Abschnitte (*Proben*) „konkurrieren“ um die gleiche Ziel-DNA (*Target*). Die beiden Proben werden bei der CGH mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei dieser Methode können in einem einzelnen Experiment, anhand der Ungleichverteilungen der Signale entlang der Chromosomen-Achsen, genomweit Veränderungen in der Kopienzahlen einzelner Bereiche identifiziert werden. Schematisch ist die Methode in Abbildung 1 dargestellt (Grafiken z.T. von S. Joos mit freundlicher Genehmigung). Ein weiterer großer Vorteil der Anwendung ist, daß keine Vorinformation über Veränderungen nötig sind.

Durch CGH konnten beispielsweise folgende hämatologische Krankheiten erfolgreich analysiert werden (Übersicht: Lichter et al. 2000):

- Chronische Myeloische Leukämie (MDS)
- Akute Lymphoblastische Leukämie
- Chronische B-Zell Leukämie
- Hodgkin Lymphom

Durch CGH neu gefundene Onkogene sind z.B. (Tabelle 1; Übersicht: Lichter et al. 2000):

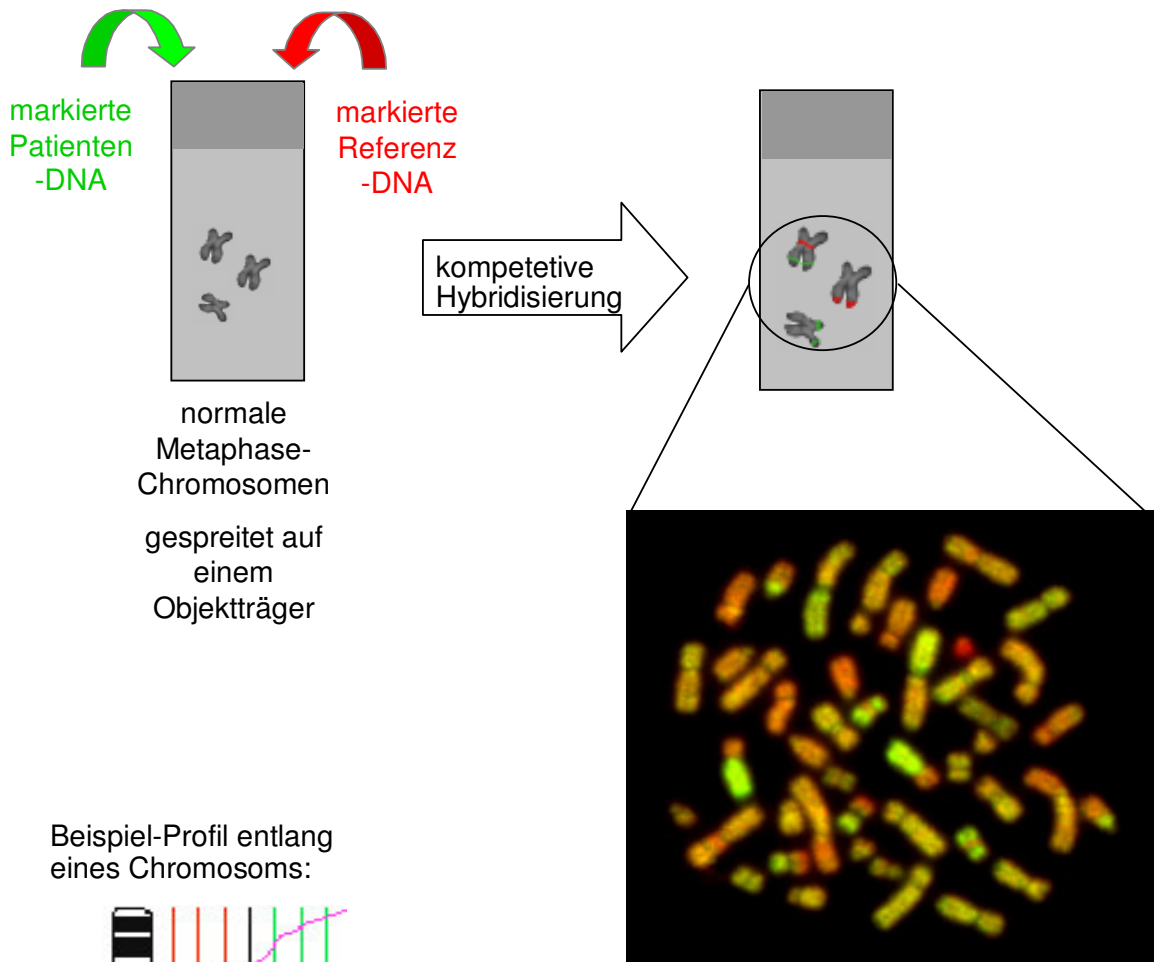
Region	Gen	Krankheit
2p12-p16	REL	DLBCL
2p23-p24	MYCN	MCL, Burkitt-Lymphom
8q24	MYC	AML, DLBCL, CBCC, MCL
18q12	BCL2	DLBCL, MZBCL, MCL

AML: acute myeloid leukemia; CBCC: centroblastic centrocytic lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; MCL: mantle cell lymphoma; MZBCL: marginal zone B-cell lymphoma.

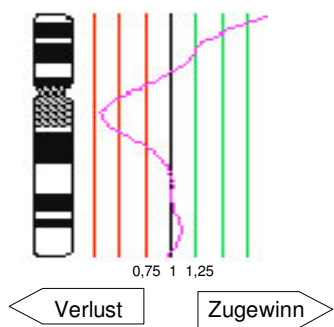
Vor allem für die Klassifizierung von *Non-Hodgkin*-Lymphomen, aber auch zur Untersuchung der Entstehung hämatologischer Neoplasien hat die CGH große Dienste geleistet. Problematisch ist gegebenenfalls ein Mangel an vorhandenen Tumorzellen, da die CGH

Chromosomale CGH

Schema der Methode (Abb. 1)



Beispiel-Profil entlang eines Chromosoms:



(Falschfarben-) Überlagerungsbild

- = Zugewinn in Patienten-DNA
- = Verlust in Patienten-DNA
- = balancierter Zustand

zur effizienten Analyse mindestens einen 35%igen Anteil an Tumorzellen in der Gewebprobe benötigt (Du Manoir et al. 1995). Es gibt daher Ansätze zur Anwendung der CGH auf Einzelzellniveau. Auch eine Vermehrung der vorhandenen Tumor-DNA mittels DOP-PCR ist möglich (Übersicht: Lichter et al. 2000).

Einige Nachteile schränken die Anwendung der CGH als Analysemethode mit hohem Durchsatz (*high throughput*) jedoch ein. Die Durchführung ist nur zu geringen Teilen automatisierbar, und sowohl die manuelle Herstellung, als auch die Auswertung der Chromosomenspreitungen sind sehr arbeits- und zeitintensiv, wodurch sie als Routinemethode nur bedingt einsetzbar ist. Aufgrund der Komplexität der Ziel-DNA (hoher Kondensationsgrad der Chromosomen im Stadium der Metaphase) ist die Auflösung der CGH beschränkt. Sie ergibt sich aus dem Produkt von Größe des Amplikons und dessen Häufigkeit und beträgt mindestens 10 Mbp für einfache Zugewinne oder Verluste, bzw. 2 Mbp für stark amplifizierte Regionen (Joos et al. 1993, Piper et al. 1995, Bentz et al. 1998, Kirchhoff et al. 1999). Kleinere Variationen, 100 kbp-große Deletionen beispielsweise, bleiben genauso unentdeckt wie Mutationen, die lediglich in einer Subpopulation der Tumorzellen auftreten. Letztere fallen in der CGH nicht auf, da hier Durchschnittswerte über sämtliche analysierte Zellen gebildet werden. Für eine Klassifizierung und eine evt. Prognose können jedoch gerade diese Zellen von entscheidender Bedeutung sein.

1.3. DNA-Microarrays I: Matrix-CGH

Eine Möglichkeit, die Auflösungsgrenze zu verringern, besteht in der Aufteilung der Ziel-DNA in kürzere Abschnitte und der Fokussierung auf einzelne Sequenzen, welche von besonderem Interesse sind. Diese werden in hoher Konzentration auf definierten Positionen einer Oberfläche fixiert, ähnlich einem Ansatz, wie er seit Jahren bei Hybridisierungen auf Membranen genutzt wird (Southern et al., 1992; Southern et al., 1994). Hier wird normalerweise mit einer radioaktiven Markierung gearbeitet, wodurch keine Möglichkeit besteht, unterschiedliche Signale parallel zu generieren. Bei Fluoreszenzmarkierungen erzeugen die Membranen einen zu starken Hintergrund. Das flexible Material erlaubt außerdem keine vollständige Automatisierung des Prozesses und aufgrund der größeren Saugfähigkeit wird eine größere Flüssigkeitsmenge benötigt. Der Einsatz von Glas als Trägermaterial schließt diese Nachteile aus. Lediglich die Bindungseigenschaften von DNA ist aufgrund der geringeren Porösität des Glases schlechter. Die Hybridisierungsmethode auf Glasobjektträger wird in dieser

Anwendungsart *Matrix- oder Microarray-CGH (mCGH)* genannt (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998).

Als Ziel-DNA werden in YACs-, PACs-, BACs- oder Cosmide-klonierte DNA-Abschnitte (vgl. Abschnitt 1.5.) verwendet, welche dem Vektorsystem entsprechend amplifiziert werden können. Das Aufbringen der in Wasser oder einer Salzlösung suspendierten DNA wurde zu Beginn der Entwicklung manuell mit Hilfe von Glaspipetten durchgeführt und wird heute von speziellen Robotern vorgenommen.

Die drei verbreitetsten Verfahren sind hierbei die folgenden (aus Ermann, 1999):

- Contact Tip Deposition Printing

Eine feine Nadel wird in die Probenlösung getaucht, und ein Reservoir in der Nadel wird über Kapillarkräfte gefüllt. Das Aufsetzen des *Tips* läßt eine kleine Menge (<1 nl) Lösung auf dem Chip zurück. Das Verfahren wurde erstmals von der Firma Synteny (Freemont, USA) zur Marktreife gebracht.

- Piezoelectric Printing

Analog zu gängigen Tintenstrahldruckern wird bei diesem Verfahren die in eine Spitze aufgesogene Lösung über ein Piezo-Element auf die Oberfläche gespritzt.

- Photolithographische Verfahren

In Anlehnung zur Halbleiter-Chip-Herstellung in der Mikroelektronik wurden v.a. von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) Verfahren entwickelt, die eine in-situ Synthese von Ziel-DNA auf Arrays erlauben. Oligonukleotide werden dabei zusammengesetzt, indem photosensitive chemische Schutzgruppen an genau definierten Positionen entfernt und die gewünschten Nukleotide - wiederum mit eigenen Schutzgruppen gekoppelt - angelagert werden können. Die einzelnen Positionen werden durch aufgelegte feine Masken bestimmt. Diese Schritte werden mehrere Male wiederholt, sodaß unterschiedliche Sätze von definierten Oligomeren entstehen.

Die DNA-Chips können aus bis zu vielen Tausend unterschiedlichen Zielstellen bestehen und haben Dimensionen von ca. 2 x 4 cm² (Abb. 2). Als Oberfläche wird Glas oder Silizium genutzt, welches z.T. mit unterschiedlichen Methoden vorbehandelt wird, um die Anheftung der Nukleinsäuren zu erleichtern.

Abbildung 2: DNA-Chip dieser Studie mit 500 Zielstellen auf einer Glasoberfläche



Als Probe wird DNA aus Tumorgewebe vom Patienten (Test), sowie als Vergleich DNA aus gesundem Gewebe (Referenz) mit unterschiedlichen Markierungen versehen. Dies kann durch den direkten Einbau von Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden in die Nukleinsäure-Moleküle (Nick-Translation, Abschn. 2.2.1.2.) oder mittels eines indirekter Nachweises, beispielsweise über markierte Antikörper oder enzymatische Reaktionen (z.B. Solinas-Toldo et al. 1997), erfolgen.

Um die Spezifität der Detektionsreaktion zu gewährleisten, ist es entscheidend unspezifische Sequenzabschnitte, z.B. repetitive DNA-Abschnitte, durch Zugabe von absättigenden Gegenstücken der eigentlichen Hybridisierung zu entziehen.

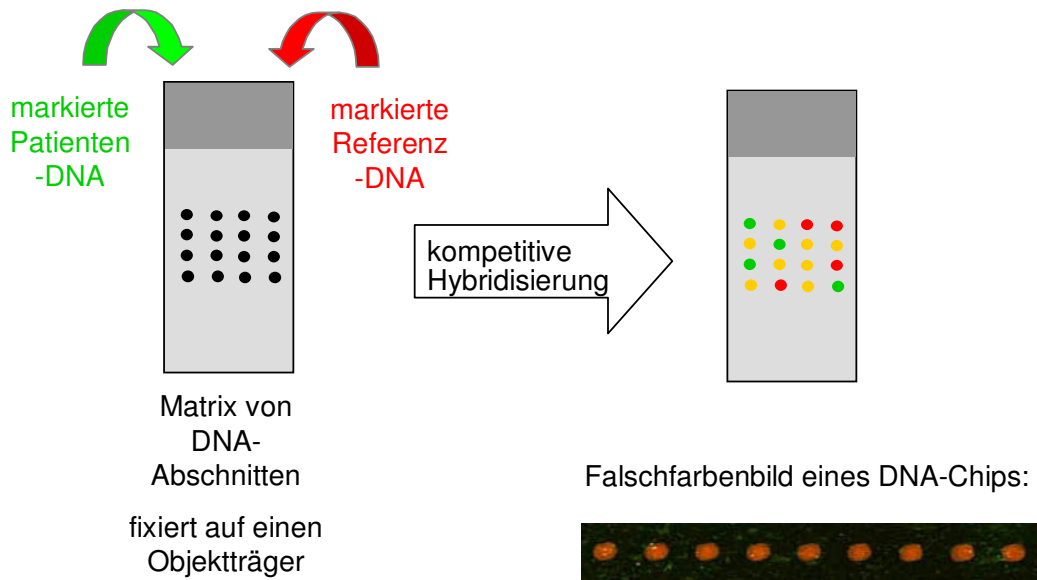
Zumindest bei der direkten Markierung können sofort die Signalintensitäten gemessen und Aussagen über Imbalancen zwischen Test- und Referenz- Genom getroffen werden. Über- und Unterrepräsentationen einzelner Bereiche können aus dem Verhältnis der Signale Test-/Referenz-Probe (Ratio) an den entsprechenden Zielstellen der DNA-Matrix abgelesen werden. Abbildung 3 zeigt den Ablauf der mCGH schematisch.

Eine Besonderheit der Matrix-basierten CGH ist z.B. die Möglichkeit, DNA-Microarrays zu konstruieren, welche spezifisch zur Analyse von chromosomalen Veränderungen einzelner Krankheiten bzw. von definierten Loci des Genoms ausgelegt sind (Wilgenbus, K.K. & Lichter, P. 1999, Lampel et al. 2000).

So ist z.B. die Region 14 auf dem langen Arm des Chromosoms 13 reich an Genen und in Bezug auf verschiedene Krebserkrankungen von besonderem Interesse. Hierzu zählen beispielsweise die *Chronische lymphatische Leukämie des B-Zell-Typs* (B-CLL) und das Kolon-Karzinom. In der betrachteten chromosomalen Region 13q14 ist das bereits erwähnte Tumorsuppressorgen *RB1* lokalisiert, sowie *CHC1L* (Chromosome condensation 1-like), *KPNA-3* (Karyopherin alpha-3) und die Gene *Leu5* („DGN“), *BCMS* (*B-cell-related malignancy with multiple splicing; t5*) und *BCMSUN* (*BCMS-upstream neighbour; t4*), welche möglicherweise ein weiteres TSG beinhalten (Stilgenbauer 1998, Kapanadze 1998, Mertens, D. 2000; vgl. Abb. 4).

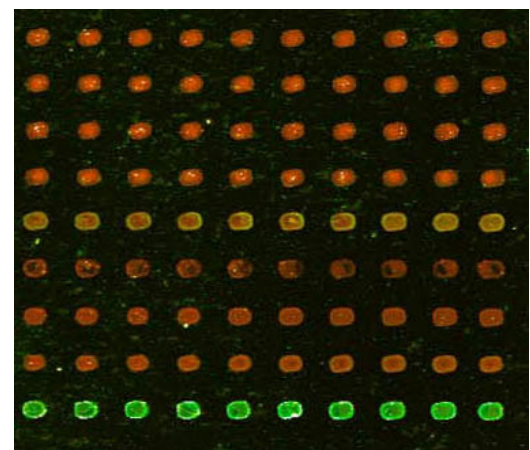
Matrix-CGH

Schema der Methode (Abb. 3)



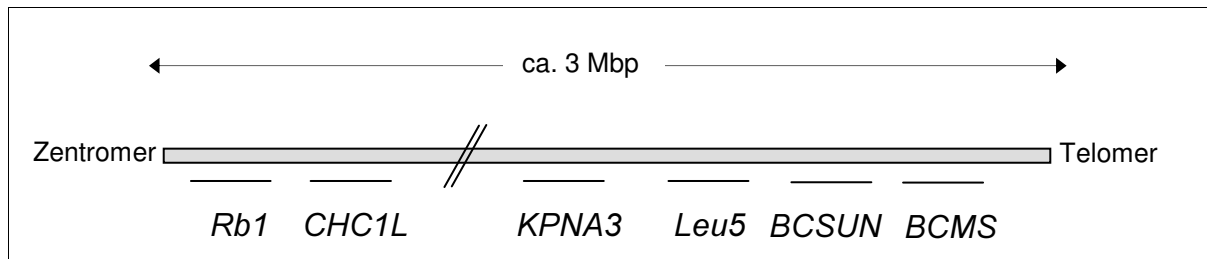
Ratio an einer definierten Position der Matrix entspricht der jeweiligen genomischen Repräsentation:

$$R_{x,y} = \frac{\text{Intensität A}}{\text{Intensität B}}$$



- = Zugewinn in Patienten-DNA
- = Verlust in Patienten-DNA
- = balancierter Zustand

Abbildung 4 : Schematische chromosomale Karte 13q14



Obwohl die **B-CLL** als häufigste Leukämieform bei Erwachsenen in westlichen Ländern vorkommt, sind viele der molekularen Ursachen noch unbekannt. Die häufigste chromosomalen Veränderungen in entarteten B-Zellen ist eine Deletion innerhalb der Region 13q14 zwischen *RB1* und dem Marker D13S25 (Stilgenbauer, S. et al. 1998, Kapanadze, B. et al. 1998).; vgl. Abb. 4).

Beim **Kolon-Karzinom** handelt es sich um die fünfthäufigste Karzinomart (nach Bronchial-, Magen-, Mamma- und Zervikalkarzinomen). Es ist die Ursache für 13% aller Karzinom-bedingten Todesfälle und stellt 95% aller Adenokarzinomfälle dar (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 256. Aufl. 1990). Hier ist eine Amplifikation auf dem langen Arm des Chromosoms 13 ein chromosomales Merkmal (vgl. Abschnitt 3.1.).

1.4. DNA-Microarrays II: cDNA-Matrix-CGH

Die Auflösungsgrenze bei Matrix-CGH-Untersuchungen ist abhängig von der Größe und der chromosomalen Nähe der gewählten Ziel-DNA. In bisherigen Experimenten wurden oft DNA-Abschnitte genutzt, welche in PACs (*P1 artificial chromosomes*) kloniert waren. Dieser Vektor stammt vom Phagen P1 ab, welcher ein ca. 100 kbp-großes Genom besitzt und den Einbau von 75 - 130 kbp-großen DNA-Sequenzen erlaubt. Die integrierte genomische Fremd-DNA kann dann in *E.coli*-Bakterien vermehrt werden. Weitere Vektor-Systeme sind YACs (*yeast artificial chromosomes*), welche als lineare Vektoren mit Replikations-Startstelle (ORI), Zentromer und Telomeren der Hefe das Einklonieren von bis zu 1 Mbp-langen Sequenzen ermöglichen und in Hefe amplifiziert werden können. Tabelle 2 zeigt gängiger *Insert*-Größen einiger Vektorsysteme.

Tabelle 2: Vektorsysteme und gängige *Insert*-Größen (z.T. aus Mülhardt 1999)

Vektor	Insertgröße
YAC	bis 1 Mbp
BAC	100 - 200 kbp
PAC	70 - 130 kbp
Cosmid	40 - 50 kbp
Plasmid	bis 3 kbp

Die Anwendung einer Matrix aus PAC-DNA als Hybridisierungsziel erlaubt der mCGH eine ca. 100fach höhere Auflösung gegenüber der chromosomalen CGH. Hierdurch ist eine wesentlich feinere Kartierung von Imbalancen im Genom möglich. Eine weitere Steigerung könnte durch den Einsatz von kürzeren Nukleinsäure-Molekülen erreicht werden.

Pollack et al. berichteten 1999 über dem Einsatz von cDNA-Molekülen als Hybridisierungs-Ziel bei CGH-Experimenten (Pollack et al. 1999). Indem hierbei lediglich exprimierte, codierende (Exon-) Bereiche des Genoms benutzt werden, beträgt die Auflösung theoretisch 0,5 bis 2 kbp und die Analyse kann auf aktive Gene fokussiert werden. Ein weiterer entscheidender Vorteil von cDNA als Hybridisierungs-Ziel ist die gute Verfügbarkeit: Durch das Fortschreiten des Human-Genomprojektes sind viele wichtige Gen-Sequenzen bereits in Datenbanken abrufbar (z.B. GenBank, dbEST, UniGene). Die Präparation von cDNA ist relativ unkompliziert. Reizvoll ist ferner die Möglichkeit, die cDNA-Microarrays sowohl für genomische Hybridisierungen, als auch für Expressionsstudien verwenden zu können.

In der genannten Arbeit wurde DNA der Brustkrebs-Zelllinie BT474 gegen normale genomische Leukozyten-DNA auf Microarrays mit ca. 5.000 cDNA-Zielen hybridisiert. Es wurden ferner Hybridisierungen mit DNA aus Zelllinien, welche unterschiedliche Anzahlen an X-Chromosomen besitzen, durchgeführt. Diese Experimente konnten die Durchführbarkeit und Sensitivität der cDNA-Matrix-CGH-Methode zeigen.

Seit dieser ersten Veröffentlichung folgten jedoch keine weitere Berichte über erfolgreiche Anwendung von cDNA-Microarrays für genomische Hybridisierungen. Ähnliche Bemühungen in anderen Labors blieben erfolglos (P. Meltzer, NIH; D. Pinkel, UCSF; S. Lampel, DKFZ Heidelberg, pers. Mitteilungen).

1.5. DNA-Microarrays III: Expressions-Chips

Lediglich 5-10% der vorhandenen Gene sind nach heutigem Verständnis in einer Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt aktiv, d.h. sie werden transkribiert und gegebenenfalls in Proteine übersetzt. Diese sich wandelnde Gen-Gruppe ist besonders interessant und erlaubt Aussagen über den physiologischen Zustand der jeweiligen Zelle. Mit der Entwicklung von DNA-Chips ist es jetzt möglich geworden, große Gruppen von Genen, unter zumindest teilweiser Automatisierung von Abläufen, gleichzeitig zu beobachten. Die Idee, die Gesamtheit aller Gene des Menschen, bzw. eines anderen Organismus, auf wenigen Chips zur Verfügung zu haben, ist in greifbare Nähe gerückt. Zum jetzigen Zeitpunkt werden z.B. von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) bereits kommerziell DNA-Chips mit bis zu 400.000 unterschiedlichen Oligonukleotiden angeboten.

Als Hybridisierungsziel dienen bei Expressions-Chips wiederum cDNA-Abschnitte, welche in großer und wachsender Zahl in Datenbanken erfaßt und leicht erhältlich sind. Die Proben-DNA wird durch Extraktion der mRNA aus der jeweiligen Zelle und Umschreibung in cDNA durch die Methode der Reversen Transkription (Kap. 2.2.2.1.4.) gewonnen und dabei z.B. mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden direkt markiert.

Affymetrix-Chips tragen durchschnittlich 20 unterschiedliche cDNA-Sequenzen von 25 Oligonukleotiden Länge für jedes Gen das untersucht werden soll, um die statistische Verlässlichkeit der Hybridisierungssignale zu erhöhen. Jedes dieser DNA-Ziele (*perfect match*) ist ferner gepaart mit einer Sequenz, die lediglich in einer Base in zentraler Position verändert ist (*mismatch*). Hiermit wird eine interne Kontrolle eingeführt, da eine aussagekräftige spezifische Hybridisierung nur dann stattgefunden hat, wenn das erreichte Fluoreszenzsignal des *perfect match* deutlich stärker ist als das des *mismatch*.

Interessante Anwendungen sind beispielsweise die Analyse der unter veränderten Umweltbedingungen aktivierten Gene, die Expressionsmuster in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus oder das Beobachten von Tumor-spezifischen Genprodukten. Expressionsstudien sind derzeit das Hauptanwendungsgebiet der DNA-Chiptechnologie. Sie können auch dazu genutzt werden, neue Kandidatengene, die z.B. in der Tumorgenese involviert sind, zu finden. So ist die Analyse der Genaktivität in der erwähnten chromosomalen Region 13q14 ist von besonderem Interesse, da hier bereits durch *Northern-Blot*-Hybridisierungen eine differentielle Genexpression in unterschiedlichen Geweben festgestellt wurde (Wolf 2000 und D.Mertens, pers. Mitteilungen). Die Möglichkeit, diese Beobachtung mittels cDNA-Microarrays zu verifizieren, würde eine höhere Auflösung sowie eine vereinfachte Analyse weiterer verschiedener Tumor- und Normalgewebe ermöglichen.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden genomische Hybridisierungsexperimente auf DNA-Microarrays beschrieben. Auf bestehenden Protokollen mit PACs, bzw. YACs als Ziel-DNA aufbauend (Solinas-Toldo, S. et al. 1997, bzw. Lampel, S. und Nessling, M. pers. Mitteilungen), sollte die Möglichkeit untersucht werden, die Analyse von Veränderungen im Genom von Tumorzellen auf cDNA-Zielen durchzuführen.

Es wurden Microarrays hergestellt, die schwerpunktmäßig die Untersuchung der chromosomalen Region 13q14 erlauben.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

- | | |
|--|--|
| • Agarose SeaKem | Biozym Biodiagnostics, Hess. Oldendorf |
| • Antifade Vectashield | Vector, Burlingame, USA |
| • Bacto-Peptone | Difco Laboratories, Heidelberg |
| • Bacto-Tryptone | Difco Laboratories, Heidelberg |
| • Bacto-Yeast-Extract | Difco Laboratories, Heidelberg |
| • Bernsteinsäure-Anhydrid | Sigma, Heidelberg |
| • Biotin-16-dUTP | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • Borsäure | Roth, Karlsruhe |
| • Bromphenolblau-Xylen | Sigma, Heidelberg |
| • BSA | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • Colcemid | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • Cy3- und Cy5-dUTP | NEN Life Science Products, Köln |
| • DAPI | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • Digoxygenin-11-dUTP | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • DNA-Größenstandard (1 kb) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| • DNA-Massestandard (low kb-ladder) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| • EDTA | Merck, Darmstadt |
| • EGTA | Sigma, Heidelberg |
| • Ethanol | Merck, Darmstadt |
| • Ethidiumbromid | Sigma, Heidelberg |
| • Fluoreszein Avidin DCS-FITC | Vector, Burlingame, USA |
| • FixoGum | Marabu-Werke GmbH, Tamm |
| • Formamid | Fluka Chemie AG, Neu-Ulm |
| • Glycerin (87%) | Roth, Karlsruhe |
| • HCl | Roth, Karlsruhe |
| • Hefe-tRNA | GibcoBRL, Karlsruhe |
| • Humane COT-1 DNA | Sigma, Heidelberg |
| • Kalbsthymus-DNA | Sigma, Heidelberg |
| • Lambda-DNA | New England BioLabs, Schwalbach |
| • Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| • 1-Methyl-Pyrrolidinone | Sigma, Heidelberg |
| • □-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| • MOPS | Sigma, Heidelberg |
| • Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| • Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| • NaOH | Merck, Darmstadt |
| • Nukleotide (als Lithiumsalze) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • Poly(A)-DNA | Sigma, Heidelberg |
| • Primer (s. Tab. 5) | BioSprings, Frankfurt |
| • RPMI 1640-Medium | GibcoBRL, Karlsruhe |
| • Schaf-Anti-Digoxygenin-Rhodamin-Antikörper | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| • SDS | Serva, Heidelberg |

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Sephadex G-50
<u>Kits</u> | Sigma, Heidelberg |
| <ul style="list-style-type: none"> • Bio-Prime DNA Labeling System • Nick-Translation Labeling Kit • GeneAmp RNA PCR-Kit • OMNI-Script Kit • PCR-Purification Kit | GibcoBRL, Karlsruhe
Roche, Mannheim
PE Applied Biosystems, Langen
Qiagen, Freiburg
Qiagen, Freiburg |

Standardlösungen

- 0,5 M EDTA:
46,5 g EDTA in 200 ml H₂O lösen
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
ad 250 ml mit H₂O
- Gel-Ladepuffer, 1 ml:
20 µl 0,5 M EDTA
780 µl Glycerin
200 µl Bromphenolblau
- 10 % SDS:
25 g SDS in 225 ml H₂O unter dem Abzug auf 68°C erhitzen und lösen
- 20x SSC: 0,3 M NaCl
pH 7,0 0,03 M Natriumcitrat
- 1x TBE-Puffer:
900 mM Tris
900 mM Borsäure
10 mM EDTA
pH 8,0 mit Borsäure

Enzyme

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • AmpliTaq DNA-Polymerase • „Big-Dye Terminator RR-Mix“ • DNA-Polymerase I (E.coli) • DNase I [3U/µl]
3 µg/µl-Stocklösung: 50 mM NaCl und
50% Glycerin • Native Pfu DNA-Polymerase • Reverse Transkriptase: Advantage
cDNA - Polymerase-Mix | PE Applied Biosystems, Langen
PE Applied Biosystems, Langen
New England BioLabs, Schwalbach
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Stratagene, La Jolla, USA
Clontech, Heidelberg |
|--|--|

2.1.2. Humane DNA

A. Proben-DNA

- **Referenz-DNA**
Als Maß für eine „normale“ chromosomale Verteilung wurde für die Hybridisierung auf Microarrays mit einem (als Lyophilisat vorliegenden) DNA-Pool aus Placenta-

Zellen gearbeitet (Sigma, Heidelberg). Zur Verifizierung dieser Probe wurde ferner einmalig ein Vergleichsexperiment mit genomischer DNA aus peripherem Blut einer gesunden weiblichen Probandin durchgeführt.

- **Test-DNA**

Als Standard-Patientenprobe für Hybridisierungsexperimente auf Microarrays diente die Zelllinie COLO-320 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Die Linie originiert von einer 55 Jahre alten Patientin mit einem „relativ undifferenzierten Adenocarcinom des sigmoiden Colons“ (<http://www.dsmz.de/mutz/mutz191.htm>). Aus vorangegangenen CGH-Analysen ist bekannt, daß Zellen dieser Linie eine Amplifikation der chromosomalen Region 13q14 tragen. Zur Bestätigung des Karyotyps wurde mit DNA aus der COLO-320-Linie eine Vergleichende Genomische Hybridisierung auf Metaphasen durchgeführt und ein CGH-Profil der genomischen Veränderungen erstellt (Vgl. Abschn. 2.2.1. bzw. 3.1.).

- **mRNA**

Poly (A⁺)-RNA aus normalem humanen Pankreas-, bzw. Herz-Gewebe wurde von Clontech, Palo Alto, USA, bezogen.

B. Ziel-DNA:

- **Yeast Artificial Chromosomes (YACs):**

Die YAC-Sonden wurden als Glycerin-Stocks vom C.E.P.H. (Centre d'Études des Polymorphismes Humaines, Paris, Frankreich) bezogen, von Frau M. Nessling nach Standardprotokoll (Puregene Isolierungskit) isoliert und für die Chip-Herstellung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- **P1 derived Artificial Chromosomes (PACs):**

Die PACs wurden vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes (DHG), Berlin, bezogen. Die inserierten humanen DNA-Abschnitte lokalisieren in den chromosomalen Bereichen, die hier betrachtet werden sollen und liegen in Tumorzellen teilweise verändert vor. Dies wurde mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) gezeigt (S.Lampel, pers. Mitteilung). Sie wurden in 50% Glycerin bei -80°C gelagert und mit dem in Abschnitt 2.2.2.1.1. beschriebenen Protokoll isoliert.

- **Copy-Desoxyribonukleinsäure-Moleküle (cDNAs)**

Gene und Genabschnitte (ESTs) der chromosomalen Region 13q14 wurden mit Hilfe der *Marathon-RACE-PCR*-Methode von Herrn S.Wolf aus gewebsspezifischer Boten-RNA (mRNA) (Clontech, Heidelberg) gewonnen. Die RACE-Produkte wurden in den 3,5 kb-großen Vektor *pCR-XL-TOPO* (Invitrogen, Groningen, NL) kloniert und in *E.coli*-Bakterien vermehrt. Die anschließende Isolierung wurde nach Standardprotokoll (Sambrook et al. 1989) von Frau P.Schramm durchgeführt. Eine *Reversen Transkription* lieferte die entsprechende cDNA (Abschn. 2.2.2.1.4.).

Weitere cDNAs, die auf dem DNA-Microarray als Normalisierungskontrolle genutzt wurden, konnten vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes (DHG), Berlin, bezogen werden.

2.1.3. Geräte

- ABI Prism 377 DNA Sequencer PE Applied Biosystems, Langen (Macintosh-Computer-gesteuert)
- Axioplan Fluoreszenzmikroskop (UNIX Zeiss, Oberkochen workstation gesteuert)
- CCD-Kamera (mit Kodak KAF 1400-Chip) Photometrics, Tucson, USA
- Enhanced Analysis System (Gelbilder) Herolab, Wiesloch
- PCR-Maschine HT-Primus MWG Biotech,
- PCR-Maschine Mastercycler Gradient Eppendorf, Hamburg
- PCR-Maschine Gene Amp PCR System PE Applied Biosystems, Langen 9700
- Photometer Ultraspec 2000 Pharmacia Biotech, Freiburg
- Scanner GenePix 4000A, PC-gesteuert Axon, Foster City, USA
- SMP3 Kapillar-Nadeln für Spotting-Roboter Telechem, Sunnyvale, USA
- Spotting-Roboter: OmniGrid (PC-gesteuert) Gene Machines, San Carlos, USA
- UV Stratalinker 2400 Stratagene, La Jolla, USA
- Vakuum-Zentrifuge: Vacuum Concentrator Bachofer, Weilheim/Teck
- Zentrifuge GS-6 (Sephadex-Säulen) Beckmann Instr., Fullerton, USA
- Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentr.) Heraeus Instruments, Hanau
- Zentrifuge Sorvall RC-5B Refrigerated DuPont Instr., Bad Homburg Superspeed (PAC-Präparation)

2.1.4. Sonstiges

- GAPS-Objektträger (Gamma Amino Corning Microarray Techn., Corning, Propyl-Silane Oberfläche) USA
- Superfrost + Objektträger (Aminosilan-beschichtet) Menzel, Braunschweig
- unbeschichtete Objektträger Neolab, Leonberg
- Microcon-30 Filtersystem Millipore, Bedford, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Chromosomale CGH

2.2.1.1. Präparation menschlicher Metaphase-Chromosomen aus peripherem Blut

Um Zellen in ausreichender Menge für die Präparation zu gewinnen, wird zunächst eine sogenannte Blutkultur mit 3 ml Venenblut in 50 ml Medium angelegt und für 72 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe des Mitogens Phytohämagglutinin werden die T-Lymphozyten zur Teilung angeregt. Eine Stunde vor Abschluß der Kulturdauer wird durch Zugabe von 5 mg/ml Ethidiumbromid (interkaliert in ddDNA) eine Streckung der Chromosomen bewirkt. Nach 71 h und 50 min werden die Zellen durch 10 minütige Inkubation mit 0,1 µg/ml des Spindelgiftes Colcimid in der Metaphase des Zellzyklus' arretiert. Das nach Zentrifugation (10 min, 300 x g, RT) erhaltene Zellaggregat wird in hypotonem Puffer gelöst und bei 37°C inkubiert. Die hypotone Behandlung führt zum Quellen der Lymphozyten.

Nach 17 minütiger Inkubation im 37°C-Wasserbad werden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 300 g, RT) und anschließend durch Zugabe von eiskaltem Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) fixiert. Nach mindesten 45 Minuten Inkubationszeit auf Eis werden die Schritte der Zentrifugation (10 min 450 g, 4 °C) und Fixativzugabe sechs bis acht wiederholt.

Die Objektträger werden vor Gebrauch mehrere Stunden in 100% Ethanol entfettet. Pro Spreitung werden ca. 20 µl Zellsuspension auf leicht mit Wasserdampf beschlagene Objektträger getropft. Die Präparate werden in einer feuchten Kammer langsam getrocknet und nach Entwässerung in einer Alkoholreihe von 70, 90 und 100%igem Ethanol bis zur Fortsetzung des Experiments bei -80°C gelagert.

Die Präparation der Metaphase-Chromosomen auf Objektträgern wurde freundlicherweise von Frau S. Ohl übernommen.

Blutkultur-Medium, 100ml:

- 80 ml RPMI-1640
- 20 ml FCS
- 1 ml Glutamin
- 1 ml Pennicilin-Streptomycin
- 1,5 ml PHA 15 (Wellcome, in 5 ml H₂Odd gelöst)

Hypotoner Puffer (20 ml):

- 40 mM KCl
- 0,5 mM EGTA
- 20 mM Hepes
- pH 7,4 mit 0,1 M KOH

2.2.1.2. Markierung der Proben-DNA: Nick-Translation

Die Markierung der DNA-Proben für die CGH erfolgt in einer Nick-Translation (Langer et al. 1981), eine Methode, die auch bei Microarray-Hybridisierungsexperimenten Anwendung findet.

Es werden hierbei zunächst Sequenz-unabhängig Einzelstrangbrüche durch das Enzym DNase I aus dem Bakterium E.coli in die genomische DNA eingeführt. Es bieten sich dadurch Ansatzstellen für das Enzym Polymerase I (wiederum aus E.coli), welches die Bruchstellen in einer „Reparations-Reaktion“ auffüllt. Da neben unmarkierten Nukleotiden auch solche, welche die gewünschten Markierungen tragen, Fluoreszenzfarbstoffe, bzw. in diesem Fall Biotin- und Digoxigenin-Gruppen, angeboten werden, geht die DNA entsprechend modifiziert aus der Reaktion hervor.

Die Reaktionen finden bei 16°C im Wasserbad über einen Zeitraum von 1,5 bis 2,5 h statt. Die Fragmentlänge wird nach ca. 2 h kontrolliert, indem eine DNA-Probe aus beiden Ansätzen mit Ladepuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt, kurz auf 4°C gekühlt und in einem 1%iges Agarosegel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt wird. Die markierten Fragmente sollen eine Länge von 500 bis 1000 bp aufweisen. Die Reaktionsansätze werden derweil auf Eis gelagert und können ggf. mit frischen Enzymen weiterbehandelt werden. Bei idealer Fragmentlänge werden die Reaktionen durch Zugabe von 3 µl 10% SDS und 6 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) (auf einen 300 µl-Ansatz bezogen) und 10 minütiges Erhitzen auf 68°C abgestoppt. (Enzym-Inaktivierung)

Ansatz zur Markierung von 2 µg DNA:

10 µl 10x Nicktranslations-Puffer
 10 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
 10 µl 10x Nukleotid-Mischung
 20 Einheiten DNA-Polymerase I (E.coli) [10 U/µl]
 2-4 µl DNase I, 1:1000 verdünnt [3 U/nl]
 2 µg genomische DNA
 ad 100 µl H₂O

β-Merkaptoethanol:

50 µl β-Merkapthoethanol-Stammlösung, 1M
 450 µml H₂O

10 x Nicktranslations-Puffer

500 mM Tris-HCl pH 8
 50 mM MgCl₂
 500 µg/ml BSA

DNase I [3 mg/ml]

50 mM NaCl
 50 % Glycerin
 2 mM EDTA pH 8

Nukleotid-Mischungen:

Chromosomale CGH:

- A. 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM Biotin-16-markiertes dUTP und 0,1 mM dTTP.
 B. 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,125 mM Digoxigenin-11-markiertes dUTP und 0,375 mM dTTP

Matrix-CGH:

- je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,1 mM dTTP und
 A. 0,4 mM Cy3-dUTP bzw.
 B. 0,4 mM Cy5-dUTP

Aufreinigung durch Sephadex-Säulen

Um nicht-inkorporierte Nukleotide, welche zu einem sehr hohen Hintergrundsignal führen würden, von der markierten DNA zu trennen, erfolgt eine Aufreinigung über Sephadex-Säulen. Das feinporige Säulenmaterial kann in großem Maße freie Nukleotide und Fragmente bis ca. 200 bp aufnehmen, während größere Moleküle die Matrix direkt passieren.

Zur Herstellung der Säulen wird eine 1 ml-Einwegspritze im unteren Teil mit silanisierter Glaswolle abgedichtet und mit Sephadex G-50 befüllt. Durch Zentrifugation (5 min, 2060 x g) und Nachfüllen mit Sephadex G-50 wird die Spritze bis zur 0,9 ml-Marke gefüllt. Um eine dichte, luftblasenfreie Säulenmatrix zu gewährleisten wird diese mit Sephadex-Puffer

dreimal durchspült (jeweils 5 min Zentrifugation). 3-6 µg DNA können nun auf die Säule aufgebracht werden. Nach einem 5 minütigem Zentrifugationsschritt (2.060 x g) erhält man die aufgereinigte DNA-Probe. Das Säulenmaterial, welches die ungebundenen Nukleotide enthält, wird verworfen.

Sephadex-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0
0,1 % SDS (W/V)

Sephadex G-50: 15 g Sephadex-Pulver durch 1 h
Kochen in 0,5 L Sephadex-Puffer
quellen lassen

2.2.1.3. Vorbereitung der Proben

Für eine Hybridisierungsreaktion der CGH werden je 1 µg unterschiedlich markierter Test- und Referenz-DNA mit 80 µg unmarkierter COT-1-DNA ethanolisch gefällt. Für die 30 minütige Fällungsreaktion bei -80°C wird ein Ansatz wie folgt vorbereitet:

1 µg Digoxigenin-markierte Referenz-DNA:
1 µg Biotin-markierte Test-DNA
80 µg humane COT-1-DNA (Absättigung repetetiver DNA-Abschnitte)
1/20 Volumen NaAC, 3 M, pH 5,2
2 Volumen 100% EtOH, eiskalt

Nach Zentrifugation (14.920 x g, 20 min, 4°C) und Trocknen wird das DNA-Pellet in 5 µl deionisiertem Formamid aufgenommen (30 min Schütteln) und mit der Hybridisierungslösung vermischt (erneut 30 min Schütteln).

Nach einer 5 minütiger Denaturierung bei 75°C, folgt eine 20minütige „Pre-Annealing“-Phase bei 37°C, um die Bindung der COT-1-DNA an repetetive Sequenzabschnitte zu ermöglichen.

Hybridisierungslösung:

20% Dextransulfat
2x SSC
50 mM Na-Phosphat-Puffer

Natriumphosphatpuffer, 0,5 M

0,5 M Na₂HPO₄ (7,16g / 100 ml)
mit 0,5 M NaH₂PO₄ (6,9g / 100 ml)
auf pH 7,0 titrieren

2.2.1.4. Vorbereitung der Objektträger

Nach schrittweisem Auftauen von -80°C auf RT werden die Objektträger lichtmikroskopisch kontrolliert. Es sollen idealerweise ausreichend viele Metaphase-Spreitungen zu sehen sein, die jedoch noch deutlich voneinander optisch differenzierbar sind. Eine geeignete Region wird mit einem Diamantstift auf der Objektträger-Rückseite markiert.

Die Chromosomen werden in 69°C-heisser Denaturierungs-Lösung 2 Minuten inkubiert. In einer eisgekühlten Alkoholreihe von 70%, 90% und 100%igem EtOH werden die Zellpräparate für je 5 min entwässert und dann luftgetrocknet.

Denaturierungslösung:

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0
70% deionisiertes FA
2x SSC

2.2.1.5. Hybrisierung

Die 12 µl Probenlösung wird auf den markierten Bereich eines denaturierten Objektträgers gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit FixoGum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgt ca. 48 h bei 37°C in einer feuchten Kammer.

2.2.1.6. Posthybridisierungsschritte

Es folgen Schritte zum Waschen der Objektträger und zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen.

Mit einer Pinzette wird das FixoGum vorsichtig entfernt. Die Deckgläser lösen sich in Küvetten mit 42°C warmer Waschlösung A ab. In fünfminütigen Zyklen wird die Lösung zweimal erneuert, dann drei mal durch Waschlösung B (42°C, auf 60°C vorgewärmt) ersetzt. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen erfolgt mit Rinderserum-Albumin. Dazu werden 200 µl der Blockierungslösung auf das Präparat aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Waschlösung A:

50% FA
2x SSC
pH 7,0

Waschlösung B:

0,05% TWEEN
2 x SSC
pH 7,0

Blockierungslösung:

3 % BSA
4x SSC
0,05% TWEEN

2.2.1.7. Detektion der hybridisierten DNA

Die spezifische Detektion der gebundenen DNA erfolgt durch Avidin, welches an Biotin binden kann und mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppelt vorliegt, bzw. durch Anti-Digoxenin-Antikörper, welche aus dem Schaf gewonnen und an den Farbstoff Rhodamin gebunden wurden.

Die Avidin-FITC- bzw. Anti-Digoxenin-Rhodamin-Stammlösungen werden zunächst 5 min bei 14.920 x g zentrifugiert und 1/200, bzw. 1/70 verdünnt. 200 µl der Lösungen werde auf den gekennzeichneten Bereich des Objektträgers gegeben. Mit einem Deckglas bedeckt verbleiben die Präparate 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Es folgen 3 x 5 minütige Waschschrte in Lösung C bei 42°C.

Um die Lokalisierung der Chromosomen zu erleichtern, wird die DNA unspezifisch mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt. Dazu werden die Objektträger 20 min bei RT in einer dunklen (abgeklebten) Küvette inkubiert. Nach kurzem Waschen in Waschlösung D (1 min), werden 10 µl Antifade-Lösung (Vectashield) auf die Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt im Dunkeln aufbewahrt.

Avidin-FITC-Lösung:

6 µg/µl Avidin-FITC
 1% BSA
 4x SSC
 0,1% TWEEN

Anti-Digoxogenin-Rhodamin-Lsg.:

6 µg/µl Anti-Dig.-Rhodamin
 1% BSA
 4x SSC
 0,1% TWEEN

DAPI:

200 µg/ml DAPI
 (1/5000 verdünnt)
 in 2x SSC

Waschlösung C:

4x SSC
 0,1% TWEEN
 pH 7,0

Waschlösung D:

2x SSC
 0,05% TWEEN
 pH 7,0

2.2.1.7. Aufnahme und Auswertung der Signale

Mit Hilfe eines Epi-Fluoreszenzmikroskops (Axioplan, Zeiss) und geeigneter Software (Cytovision, Applied Imaging) können die Signale bei entsprechenden Wellenlängen mittels CCD-Kamera aufgenommen werden. Die Illumination erfolgt durch eine Osram Quecksilber-Dampfampe. Die erforderlichen Wellenlängen sind in Tabelle 2 aufgelistet und werden durch Einsatz geeigneter Filter eingestellt.

Tabelle 3: Benötigte Wellenlängen (R.P.Haugland, 1996) und benutzte Filter (AHF Analysetechnik AG)

Kanal	Anregungs-Wellenlänge	Emissions-Wellenlänge	Filter-Anregung*	Charakteristika Sperrfilter*
DAPI	360 nm	460 nm	360 / 40 nm	460 / 50 nm
FITC	490 nm	520 nm	480 / 30 nm	535 / 40 nm
Rhodamin	525 nm	555 nm	540 / 25 nm	605 / 55 nm

* Maximale Durchlaß-Wellenlänge / Durchlaßintervall

Pro Hybridisierung werden 15-20 Metaphase-Spreitungen ausgewählt. Die Aufnahme und Auswertung werden Software-gesteuert. Die Speicherung erfolgt als TIFF (tagged image format-file) -Dateien mit Numerierung der jeweiligen Chromosomenspreitung.

Die teil-automatisierten Schritte der Auswertung umfassen:

- Erfassung der einzelnen Chromosomenformen durch bildanalytische Segmentierungs- und Mustererkennungs-Algorithmen, ggf. manuelle Umrandung zum Separieren von eng benachbarten Chromosomen
- Identifizierung der Chromosomen unter Zuhilfenahme von Größe und Färbemuster, manuelle Korrekturen oft nötig
- Plazieren von Centromer und Achse zwischen die beiden Chromatiden, ggf. individuelle Verschiebungen
- Generierung eines CGH-Profiles entlang der Chromosomenachse, entsprechend den gemessenen Signalintensitäten in den verschiedenen Kanälen

Die Profile sämtlicher auswertbarer Chromosomen werden jeweils gemittelt als Gesamtprofil gewertet und neben das Ideogramm des entsprechenden Chromosoms gezeichnet. Chromosomale Imbalancen werden durch Abweichung des Profils vom balancierten Status (FITC:TRITC = 1) aufgedeckt. Die diagnostischen Schwellenwerte von 0,75 für eine Unterrepräsentation und 1,25 für eine Überrepräsentation wurden in

vorangegangenen Studien ausgetestet und festgelegt (Schröck et al. 1994, Bentz et al. 1995, Du Manoir et al. 1995, Lichter et al. 1994).

2.2.2. Matrix-CGH

2.2.2.1. Präparation der Ziel-DNA

Die Nukleinsäuren, welche als Ziel-DNA eingesetzt werden, müssen isoliert und in die gewünschte Konzentration gebracht werden. Dies erfolgt entsprechend dem genutzten Vektorsystem.

2.2.2.1.1. Isolierung von PAC-DNA aus E.coli-Bakterien

Herstellung der Bakterienkulturen

Die Bakterien werden bei -80°C in 50% Glycerin gelagert. Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA isolieren zu können, müssen die Bakterien aus dieser Aufbewahrungskultur mit einem Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte, welche das Antibiotikum Kanamycin (als Selektionschemikalie) enthält, ausgestrichen werden. Nach ca. 24 h Inkubation bei 37°C kann eine Einzelkolonie zum Animpfen einer 5 ml LB/Kanamycin-Vorkultur eingesetzt werden. Nach einer 4-6 stündigen Inkubation bei 37°C verwendet man diese Kultur als Starterkultur für einen 500 ml Ansatz. Eine ausreichende Bakteriendichte wird nach 14 - 24 h Inkubation bei 37°C erreicht.

Präparation der PAC-DNA (Maxi-Präparation)

Nach Erreichen einer ausreichenden Bakteriendichte, kann die extrachromosomale DNA aus den Bakterien isoliert werden. Es handelt sich in diesem Fall um *P1-artificial chromosomes*, in welche humane DNA inseriert, und die in E.coli-Bakterien eingebracht wurden. Die Präparation erfolgt mit Hilfe des *Qiagen-Plasmid-Purification-Kits* (Qiagen GmbH, Hilden), wobei das vorgeschlagene Protokoll modifiziert wurde.

Die Bakterienkultur wird 10 min bei 4°C und $6.000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor) und das Bakteriensediment in 10 ml Resuspensions-Puffer (P1) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml P2-Lösung (Lyse-Puffer) und 5 minütiger Inkubation bei RT wird der Ansatz in ein alkalisches Milieu überführt. S2 enthält zusätzlich SDS, welches die zellulären Proteine denaturiert. Eine hohe Salzkonzentration führt zu einer Kopräzipitation der Zellstrukturen mit der genomischen DNA, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Struktur in der Lage ist, nach der Neutralisierung durch Zugabe von 10 ml P3 zu renaturieren und daher in Lösung bleibt. Die unlöslichen Bestandteile werden durch die anschließende Zentrifugation (30 min und $23.00 \times g$, Sorvall S34-Rotor) sedimentiert, wodurch ein klares Lysat entsteht.

Die DNA-enhaltende Flüssigkeit wird zunächst durch einen doppellagigen Mull grob gefiltert, um dann durch einen Faltenfilter auf eine Anionenaustauschersäule gegeben zu werden, welche zuvor mit 5 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde. Nach dem Waschen der Trennsäule mit QC-Lösung, mit welchem nicht gebundene Substanzen entfernt werden, kann die PAC-DNA mit 12 ml QF-Puffer von der Säule eluiert werden.

Luria-Broth Flüssigmedium, 1L:
(modifiziert)

10 g Glucose
10 g Trypton
10 g Hefe Extrakt
5 g Hefe RNA
5 ml Glycerin
100 ml 10x PBS
900 ml H ₂ O

pH auf 7,5

Nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C mit 1 ml/L Kanamycin (100 mg/ml) versetzen und bei 4°C lagern.

Luria Broth - Agarplatten:
(ca. 30 Stück)

5 g NaCl ₂
5 g Bactotrypton
2,5 g Yeast-Extract
7,5 g Bacto-Agar
ad 500 ml H ₂ O dd

pH auf 7,5

Nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C mit 1 ml/L Kanamycin versetzen. Gießen der Platten mit je ca. 15 ml in Petrischalen (d = 10 cm). Lagerung bei 4°C.

Resuspensions-Puffer P1

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Lyse-Puffer P2

200 mM NaOH
1% SDS

Neutralisierungs-Puffer P3

3,0 M Kalium-Acetat
pH 5,5

Äqilibrierungs-Puffer QBT

750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Triton X-100

Wasch-Puffer QC

1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol

Elutions-Puffer QF

1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 8,5
15% Isopropanol

Isopropanolfällung der PAC-DNA

Zur Konzentration und Reinigung der gewonnenen DNA wird das 12 ml Eluat der Säulen mit 8,4 ml Isopropanol vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C (20 min, Sorvall SS34). Das getrocknete Pellet wird in 300 µl H₂O gelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Es werden 10 µl 3M NaAc (pH 5,2) und 700 µl 100% EtOH (absolut) hinzugegeben und gut vermischt. Nach 30 min Inkubation bei -80°C wird 20 min bei 14.920 x g und 4°C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet kann in 10 - 100 µl H₂O rückgelöst werden.

2.2.2.1.2. DNA-Konzentrations- und -Größenbestimmung durch Gelelektrophorese

Um Größe und Konzentration der isolierten Nukleinsäuren bestimmen zu können, werden diese in einem elektrischem Feld bei einer Spannung von 10 V/cm aufgetrennt. Genutzt

werden dabei meist horizontale Agarosegele unterschiedlicher Konzentration in TBE-Puffer. Agarose ist ein natürlich vorkommendes, lineares, saures Polysaccharid. Die DNA wandert als negativ geladenes Molekül in der neutralen Pufferlösung zur Anode. Größere Moleküle werden bei der Auftrennung in stärkerem Maße von der Gelmatrix zurückgehalten als kleinere. Durch den parallelen Lauf eines Längen-, bzw. Massenstandards, der DNA-Fragmente bekannter Längen, bzw. Konzentrationen enthält, kann eine Beurteilung der DNA-Probe erfolgen.

Die DNA wird sichtbar gemacht, indem das Gel nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 µg/ml in 1x TBE) ca. 20 min gefärbt und danach unter UV-Licht (Anregungswellenlänge: ca. 254 nm, Emission: ca. 518 nm) fotografiert wird. Ethidiumbromid bindet nicht-kovalent an DNA-Stränge (Interkalation) und fluoresziert mit einer Wellenlänge von 605 nm (Haugland 1996).

Die Konzentrationsbestimmung von DNA in Agarosegelen ist bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 5 ng DNA möglich (Mülhardt 1999).

Agarose, 1%:

1,5 g Agarosepulver
ad 150 ml 1xTBE
aufkochen und mischen

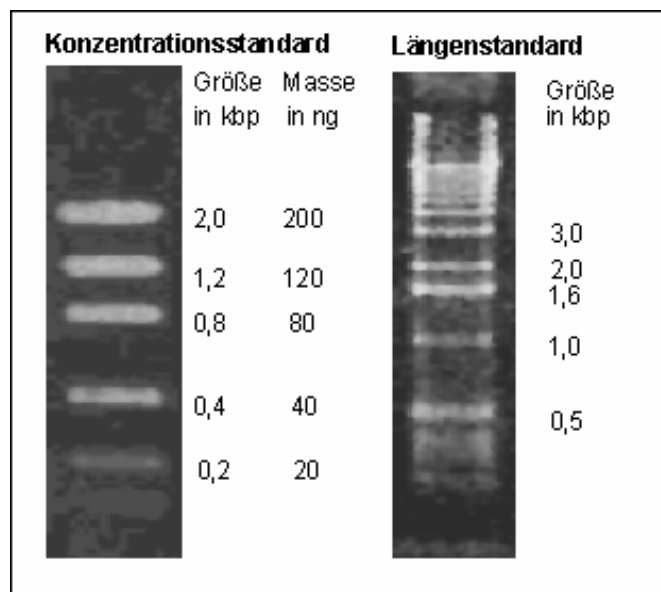


Abb. 5: DNA-Konzentrations- und Längenstandard

2.2.2.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung durch spektroskopische Vermessung

Bei der spektroskopischen Messung nutzt man die optische Dichte der DNA-Lösung, um eine Aussage über deren Konzentration zu machen. DNA in wässriger Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Nach Eichung des Photometers mit dem jeweiligen Lösungsmittel kann so ein Wert ermittelt werden, der im Bereich von ca. 0,05 und 1 OD (optische Dichte) aussagekräftig ist - was einer DNA-Menge von 2,5 bis 50 µg pro ml entspricht. Die Konzentration errechnet sich dann durch eine der folgenden Formeln (C.Mülhardt, 1999):

- $[DNA_{ds}]$ in ng/µl = $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
- $[DNA_{ss}]$ in ng/µl = $OD_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
- $[RNA_{ss}]$ in ng/µl = $OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
- $[Oligonukleotide_{ss}]$ in ng/µl = $OD_{260} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Der Quotient von OD_{260} / OD_{280} gibt ferner einen Hinweis auf die Reinheit der DNA bzgl. vorhandener Proteinreste in der Probe. Dabei zeigt theoretisch ein Wert von 2,0 die

größtmögliche Reinheit an, praktisch liegt dieser Wert bei 1,7 - 1,9. Bei Werten unter 1,5 liegt eine Verunreinigung durch Proteine vor.

2.2.2.1.4. Reverse Transkription von mRNA

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus Zellen isolierte Boten-RNA (mRNA) in DNA (als sog. cDNA, copy-DNA) umgeschrieben werden. Als Startstücke der Synthese werden hier Zufallskombinationen aus sechs Nukleotiden (Hexamer-Primer) genutzt, die an unterschiedlichen Stellen an die RNA binden können.

Die ausgewählten Gene des chromosomalen Bereiches 13q14 wurden hierbei gewonnen, indem Lungen-mRNA (Clontech, Heidelberg) durch Reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben und anschließend mit der im nächsten Abschnitt beschriebenen Polymerase-Ketten-Reaktion die entsprechenden Regionen spezifisch amplifiziert wurden.

Für die RT wurden zwei kommerzielle Kits verwendet, die beide eine ausreichende Ausbeute lieferten.

Ansatz A mit GenAmp-Kit von Perkin-Elmer AB:

MgCl ₂	16 µl
10xPCR-Puffer II	8 µl
H ₂ O	8 µl
dGTP, dATP, dCTP, dTTP	je 8 µl
RNAse Inhibitor	4 µl
Reverse Transkriptase	4 µl
Hexamerprimer (50µM)	4 µl
RNA (1µg/µl)	8 µl
	(84 µl Ansatz)

- ca. 10 min bei RT inkubieren
- 1,5 h bei 37°C inkubieren
- 5 min bei 99°C inaktivieren

Ansatz B mit Thermo-Mix:

Display RT-Puffer	8 µl
H ₂ O	16 µl
dNTP-Mix (5mM)	4 µl
Initiator-Mix	2 µl
Hexamer-Primer (aus GeneAmp-Kit)	4 µl
RNA (1 µg/µl)	2 µl
	(36 µl-Ansatz)

Inkubationszeiten:

- ca. 5 min bei RT
- 10 min bei 65°C
- 40 min bei 42°C
- 15 min bei 65°C

Das Ergebnis der RT-Reaktion wird erst nach der spezifischen Amplifikation in der Gelelektrophorese sichtbar.

2.2.2.1.5. cDNA-Amplifikation mittels *Polymerase-Ketten-Reaktion*

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) hat seit ihrer Erfindung Ende der 80er Jahre (Saiki et al. 1985 & 1988) die Molekularbiologie revolutioniert. Mit Hilfe des Enzyms Polymerase und eines DNA-Primer-Paares, welches spezifisch an Sequenzen beidseitig eines gewünschten DNA-Abschnitts bindet, läßt sich eine exponentielle Vervielfältigung von Nukleinsäuren erreichen. Der Einsatz hitzestabiler Polymerase (z.B. *Taq* von *Thermus aquaticus*) erlaubt eine Automatisierung in PCR-Maschinen (Thermocyclern), welche die zyklische Abfolge von unterschiedlichen Temperaturstufen steuern und nach folgendem Schema arbeiten:

- A. Einleitende Denaturierungs-Phase der ddDNA bei ca. 94 °C
 - B. Ca. 30 sec Denaturierungs-Phase der ddDNA bei ca. 90 °C
 - C. Anlagerungsphase der Primer an die ssDNA bei 50-60 °C
 - D. Arbeitsphase der Polymerase bei 72 °C (Sequenzverlängerung), zeitlich angepaßt der Länge der zu amplifizierenden Sequenz
- Zyklische Wiederholungen der Schritte B, C und D, bis in exponentiellen Schritten eine ausreichende Menge an DNA produziert wurde.
- E. Abschließende Verlängerungsphase noch unvollständiger Produkte bei 72 °C
 - F. Arretierung der Enzymreaktion bei 4 °C

Für jede Matrizen- / Primer-Kombination müssen Idealbedingungen ermittelt werden, bei denen sowohl Temperatur als auch zeitliche Beschränkungen und Zyklenzahl variieren können.

Für die Amplifikation der als Hybridisierungs-Ziele genutzten cDNAs, deren Bezeichnungen in Abschnitt 7.3. des Anhangs näher spezifiziert werden, wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Primer genutzt und die PCR mit folgenden Bedingungen optimiert:

PCR für ausgewählte Gene des chromosomalen Bereiches 13q14

(in *Mastercycler Gradient* PCR-Maschine):

A. 96 °C 3'

30 x

B. 96 °C 20''

C. spezifische Annealing-Temperatur 20'' ►

D. 72 °C 1'45''

E. 72 °C 15''

F. 4 °C --

<i>Leu5:</i>	63 °C
<i>t4:</i>	65,2 °C
<i>CHC1L:</i>	63 °C
<i>Rb1:</i>	63 °C
Promotor:	60,7 °C
<i>KPN-3:</i>	67,2 °C

PCR für cDNAs (ESTs) des Bereiches 13q14

A. 94 °C 2'

30 x

B. 94 °C 10''

C. 57 °C 30''

D. 72 °C 1'

E. 72 °C 5'

F. 4 °C --

PCR für ATM-cDNAs

PCR für Normalisierungs-Kontroll-cDNAs

- | | |
|---------------|--------------------------|
| | (Gene anderer Regionen): |
| A. 94°C 3' | A. 94°C 5' |
| 30 x | 30 x |
| B. 94°C 45" | B. 94°C 30" |
| C. 60°C 1' | C. 55°C 30" |
| D. 70°C 1'30" | D. 72°C 1' |
| E. 70°C 7' | E. 72°C 5' |
| F. 4°C -- | F. 4°C -- |

Tab. 4: Primersequenzen

amplifiziertes Gen	Sequenz (5' - 3' - Richtung) *
Gene des Bereiches 13q14:	
<i>KPN-3 (fwd)</i>	GCA GCC GCA GGA GTA GCC
<i>KPN-3 (rev)</i>	TGG GAA AGA TGC TGC ACT CA
<i>Rb1 (fwd)</i>	ACA AAT GGA AGA TGA TCT GGT G
<i>Rb1 (rev)</i>	AGA GGA CAA GCA GAT TCA AGG TG
<i>t4 (fwd)</i>	CGG GTG ATG CCT GAT CTC ATC
<i>t4 (rev)</i>	GATACTCTCCTGTAGTCCTC
<i>CHC1L (fwd)</i>	GTT AAT TCG TCA GGC TTG TGT C
<i>CHC1L (rev)</i>	TTG TGT TAC TAC AGT CAG ATG G
<i>Leu5 (fwd)</i>	AAA TAC ATC AGC TTG TAG GAG AC
<i>Leu5 (rev)</i>	AAT TCT GCC ACA TTG TTC AGT AC
Promotorregion	CGAGTGATGCCTGATCTCATC
Promotorregion	GTCCAGCATCTTTCCTAAGAG
ESTs des Bereiches 13q14 und weitere Kontroll-cDNAs:	
M13-Primer (fwd)	CGT TGT AAA ACG GCC AGT
M13-Primer (rev)	TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC
ATM-Gen-Exons:	
<i>ATM #4A (fwd)</i>	AAGATGTTGTTGTCCCTACTATG
<i>ATM #4B (rev)</i>	AAGGCTGAATGAAAGGGTAATTC
<i>ATM #8 n1A (fwd)</i>	AGGCATACATCACAATTTGG
<i>ATM #8 n1B (rev)</i>	TTGCTCAGAACTTATACCACG

* Synthetisiert wurden die Primer von der Firma Bio-Springs, Frankfurt.

2.2.2.1.6. Amplifikation von YAC-DNA mittels *ALU-long range PCR*

Die in künstliche Hefe-Chromosomen klonierten humanen DNA-Abschnitte beinhalten repetetive Sequenzwiederholungen. Dabei handelt es sich um hochrepetetive ALU-Einheiten (auch als *short interspersed nuclear elements*, *SINEs* bezeichnet), die 280 bp oder kürzer sind und verstreut hauptsächlich im euchromatischen Bereich auftreten. Insgesamt stellen sie ca. 10% des Genoms dar (Buselmaier & Tariverdian 1999).

Diese ALUs werden als Anlagerungsstelle von entsprechenden Primern benutzt, um in einer Polymerase-Kettenreaktion, welche in diesem Fall *Interspersed repetitive sequence - long range - polymerase chain reaction (IRS-LR PCR)* genannt wird (Wilgenbus et al. 1995), die klonierten humanen Sequenzabschnitte zu amplifizieren. Entsprechend der multiplen Bindungsstellen entsteht ein Gemisch unterschiedlicher DNA-Fragmente.

Tabelle 5: ALU-Primersequenzen

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3' - Richtung) *
Ale-1	GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G
Ale-3	CCA CG CAC TCC AGC CTG GG
Alu S	GAG GTT GCA GTG AGC CGA GAT
Alu J	GAG GCT GCA GTG AGC CGT GAT

Alu S und Alu J werden im Verhältnis 1:4 gemischt und drei separate PCR-Ansätze wie folgt vorbereitet:

- 0,6 µl vermischte Polymerasen (1:10 PfU / Taq)
- 5 µl 10x Puffer
- 5 µl Nukleotid-Mischung
- 0,5 µl Primer [1 µM] (Ale1, Ale3 oder Ale S/Ale J)
- 20 - 50 ng DNA
- ad 50 µl mit H₂O dd

Nukleotid-Mischung:

je 2 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP

10x Puffer:

500 mM Tris/HCl, pH 9,3
160 mM NH₄SO₄
20 mM MgCl₂

PCR-Programm:

A. 2 min 94 °C
28 x
 B. 30'' 96 °C
 C. 1' 55 °C
 D. 5' 72 °C
E. 10' 72 °C
F. 4 °C --

Für jeden der YACs, die in Abschnitt 7.3. des Anhangs näher spezifiziert werden, wurden drei separate Reaktionen mit den verschiedenen Primern durchgeführt und die Ansätze nach der PCR vereint.

2.2.2.1.7. Aufreinigung der PCR-Produkte mittels PEG-8000

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA-Abschnitte erfolgte mittels 40% Polyethylenglycol (PEG-8000) nach dem Protokoll von *Paithankar und Prasad (1991)*. Hiermit wird ein Abtrennen von Oligonukleotiden und Fragmenten, die kleiner als ca. 200 bp sind, erreicht. Zu den vereinten PCR-Fractionen werden 1/100 Volumen $MgCl_2$ und 1/2 Volumen PEG-8000 gemischt. Eine 30 min Inkubation bei $-80^\circ C$ verbessert die Effektivität. Nach Zentrifugation bei $14.920 \times g$ (15 min bei $4^\circ C$) folgt ein zweimaliges Waschen mit 70% EtOH. Das anschließend getrocknete DNA-Pellet kann dann im gewünschten Volumen H_2O gelöst werden.

2.2.2.2. Markierung der Proben-DNA:

Zur simultanen Detektion unterschiedlicher Proben in einem Hybridisierungsexperiment müssen klar differenzierbare Markierungsmethoden angewendet werden. Hier zeigt sich eine Beschränkung der traditionellen Hybridisierungsprotokolle, welche mit radioaktiver Markierung arbeiten und somit auf einem Röntgenfilm lediglich eine Art von Signal nachweisen können. Die Auswahl an Fluoreszenzfarbstoffen ist dagegen sehr groß und wächst noch immer kontinuierlich. Hier kommt es nun darauf an, geeignete Chemikalien zu finden, welche:

- a. stabil sind
- b. sich gut an die DNA koppeln lassen
- c. ansonsten aber nicht mit der Probe oder anderen Komponenten der Hybridisierungslösung interagieren
- d. voneinander deutlich unterscheidbar sind
- e. mit den zur Verfügung stehenden Meßmethoden erfaßbar sind

Die Fluoreszenzfarbstoffe Cyanin 3 (Cy3) und Cyanin 5 (Cy5) haben sich auf dem Gebiet der DNA-Chiptechnologie etabliert, da die obigen Punkte meist zutreffen und die Signale auch im trockenen Probenzustand erhalten bleiben, im Gegensatz zu z.B. Rhodamin, welches beim Trocknen seine fluoreszierenden Eigenschaften weitestgehend verliert. (Vgl. auch Abschnitt 3.3.: Stabilität des Fluoreszenzsignals).

Tabelle 6: Charakteristika der Fluorochrome Cy3 und Cy5 (Haugland 1996)

Farbstoff	max. Anregungswellenlänge	max. Emissionswellenlänge
Cy3	575 nm	605 nm
Cy5	640 nm	705 nm

Die Markierung der DNA erfolgt in getrennten Ansätzen für Tumor- (Test-) und Referenz-Probe durch die Nick-Translation, eine Methode, welche bereits bei der Beschreibung der chromosomalen CGH beschrieben wurde (Abschnitt 2.2.1.2.). Alternativ zu dem dort beschriebenen Ablauf wurde eine Nick-Translation mit Chemikalien eines *Labeling-Kits* von Roche, sowie eine Markierungsreaktion nach Restriktionsverdau durch das Enzym *Hae III* durchgeführt.

Markierung durch Nick-Translation mit Labeling Kit (Roche)

Die Reaktion verläuft analog zur beschriebenen Nick-Translation. Es wird folgender Ansatz in einem 40 μl Volumen verwendet:

- 2 μg genomische DNA
- 5fach Fluorophore-Mix
- 50% Nick-Translations-Mix (Roche)

Fluorophore-Mix, 5fach: je 0,25 mM dATP, dGTP, dCTP

0,34 mM dTTP
 0,08 mM Fluorescein-12-dUTP
 H₂O ad 50 µl

Nick-Translations-Mix:

DNA-Polymerase I und Dnase I in 50% Glycerin und 5fach Puffer

Markierung nach Restriktionsverdau

Der Einbau von Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden kann auch nach einem Verdau der genomischen DNA durch ein Restriktionsenzym erfolgen (Pollack et al. 1999). Dabei werden Chemikalien aus dem *Bioprime Labeling Kit* von GibcoBRL eingesetzt.

2 µg genomische DNA werden durch 40 Units des Enzyms *Hae III* ü.N. bei 37°C in Enzym-spezifischem Puffer verdaut. Ein Ansatz von 40 µl Volumen liefert gute Ergebnisse.

Die Reaktion wird durch 10 minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt und dann mit Hilfe des *PCR-Purification Kits* von Qiagen aufgereinigt. Die DNA wird mit 21 µl H₂O eluiert.

Vor der eigentlichen Markierungsreaktion wird durch Zugabe von 20 µl des Reaktionspuffers (BioPrime-Kit) und 5 minütigem Kochen die DNA denaturiert. Nachdem hierdurch die zugegebenen Hexamer-Primer (BioPrime-Kit) angelagert wurden, werden auf Eis 5 µl Nukleotid-Mischung, 3 mM markierte Nukleotide (Cy3-, bzw. Cy5-dUTP) und ca. 40 Units des Kleenow-Fragments der Polymerase I (BioPrime-Kit) hinzugegeben.

Nach 2 h wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 abgestoppt und mit einem Microcon-30-Filter (Millipore) gereinigt.

- Erkennungs-Sequenz von *HaeIII*: GG / CC

Reaktions-Puffer:

125 mM Tris pH 6,8
 12,5 mM MgCl₂
 25mM β-Merkaptoethanol
 2,5x Random-Hexamer-Primer

10x Nukleotid-Mischung:

je 1,2 mM dATP, dGTP, dCTP
 0,6 mM dTTP
 10 mM Tris pH 8,0
 1 mM EDTA

2.2.2.3. Vorbereitung der Objektträger

Um die negativ geladenen Nukleinsäuren auf einer Glasoberfläche besser zu fixieren, können die Objektträger vorbehandelt werden. Eine Möglichkeit ist das Beschichten der Oberfläche mit neutralisierenden Substanzen, wie z.B. Poly(L)-Lysin, welche mit freien positiven Ladungen eine Verknüpfung erlauben. Eine andere Möglichkeit, unbeschichtete Glas-Objektträger zur Bindung der DNA vorzubereiten, besteht in der Behandlung mit Natronlauge. Hierdurch wird die Oberfläche des Glases chemisch angegriffen (angeraut) wodurch das Haften der DNA erleichtert wird. Dazu müssen die Objektträger ca. 2h in der NaOH-Lösung inkubiert werden, dann drei mal mit Wasser gewaschen und getrocknet werden.

NaOH-Lösung:

40 g NaOH in
 150 ml H₂O dd (unter Rühren in
 Eisbehälter) lösen
 200 ml 95% Ethanol, 5 min mischen
 gegebenenfalls 5 -10 ml H₂O dd dazugeben bis keine Trübung mehr
 zu sehen ist.

2.2.2.4. Aufbringen der Ziel-DNA auf die Objektträger

Das Aufbringen der Ziel-DNA auf die Objektträger (*Spotting*) wird durch einen Roboter, einen sog. *Arrayer*, vorgenommen. Der *Omnigrad* von Gene Machines arbeitet mit einem Tablett, welches mit maximal 100 Chips bestückt werden kann und in x-Richtung beweglich ist (Abb. 6.a). Ein Roboterarm bewegt sich dagegen in y- und z-Richtung und bringt die DNA-Lösungen auf, indem er diese aus den einzelnen Reservoirs einer 96er oder 384er Mikrotiterplatte entnimmt und an definierter Position auf den Chips abgibt. Er ist hierzu mit zwischen 1 bis 32 Nadeln ausgerüstet. Die Nadeln nehmen die Lösungen über Kapillarkwirkung in einen schmalen Spalt auf und speichern sie in einem Reservoir (*Split-Pins*, Abb. 6.b). Durch direkten kurzen Kontakt mit der Glasoberfläche wird ein geringes Volumen (ca. 0,2 nl) abgegeben (*Contact Tip Deposition Printing*).

Von jeder DNA-Lösung werden 8 -14 Replikationen auf dem Chip aufgebracht, um die Ausfallwahrscheinlichkeit einzelner Werte zu reduzieren und eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Im Normalfall werden die Replikas dabei vertikal zum Objektträger direkt nebeneinander aufgebracht, sodaß ein rechteckig langgezogener Chip entsteht. Hinzu kommen an den horizontalen Seitenränder Replikas von Hybridisierungs- bzw. Orientierungs-Kontrollen, welche in Tabelle 7 beschrieben sind. Die Ziel-DNA wird entweder in H₂O, in 2x oder in 3xSSC gelöst auf die Objektträger aufgebracht.

Tab. 7: Hybridisierungs- und Orientierungs-Kontroll-Ziele

Target	Konzentration	Bedeutung
direktmarkierte DNA (Cy5 bzw. Cy3)	0,1 µg/µl	Markierung von Anfang und Ende des DNA-Chips
Humane Gesamt-DNA	1 µg/µl	Positiv-Kontrolle der Hybridisierung
Kalbsthymus-DNA	1 µg/µl	Negativ-Kontrolle der Hybridisierung
Lambda-DNA	1 µg/µl	Negativ-Kontrolle, Hintergrundbeurteilung
SDS	0,4 %	Hintergrundbeurteilung
humane COT1-DNA	1 µg/µl	Überprüfung der Suppression

Abb. 6.a

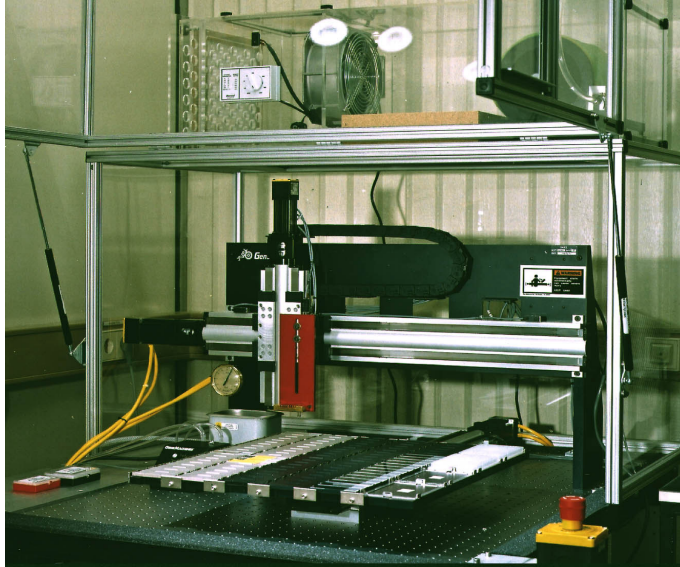


Abb.6: Roboter und Split-Pin

a. Der Omnigrid-Roboter von Gene Machines wird zum Aufbringen der Ziel-DNA-Lösung verwendet. Er arbeitet mit einem beweglichen Tisch und einem Arm, welcher einen oder mehrere Kapillarnadeln hält.

Grafik: DKFZ-Archiv

b. Bei den Nadeln handelt es sich um Split-Pins, die Flüssigkeit in ein Reservoir aufnehmen und durch einen feinen Spalt bei Kontakt mit dem Objektträger abgeben können.

Grafik: M.Shena: DNA-Microarrays, 1999

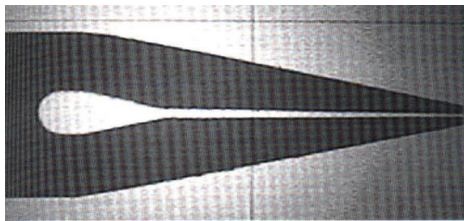


Abb. 6.b



Abb. 7: Scanner

Es handelt sich um ein Epifluoreszenz-Gerät von Axon (Genepix 4000 A), welches mit zwei Laser- und PMT-Systemen ausgerüstet ist.

Grafik: <http://www.axon.com>

Abb. 7

2.2.2.5. Vorbereitung der Objektträger zur Hybridisierung

Der Bereich des Objektträgers, der die gespottete DNA enthält, wird mit einem Diamantstift auf der Rückseite markiert. Zum Fixieren wird die DNA auf dem Chip ca. 20 min auf 80 - 100°C erhitzt und durch UV-Bestrahlung (2 mal 120 mJ) im Stratalinker-Gerät kovalent mit der Glasoberfläche verbunden. Werden die Objektträger zwischenzeitlich gelagert, kann vor dem nächsten Schritt ein Erhitzen auf 90°C (5 min) und eine kurze Inkubation in 70% Ethanol vorhandenes Salz herausgelöst werden. Hierdurch wird das Rehydrieren der Ziel-DNA verhindert und so ein Abwaschen der aufgebracht DNA vermindert.

Die Glasoberfläche, auf der sich keine Ziel-DNA befindet, könnte während der Hybridisierungsreaktion unspezifisch DNA der Test-/Referenz-Fraktion binden und so zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz führen. Dies kann z.B. durch Inkubation der Chips in Lösungen verhindert werden, welche inaktivierende Chemikalien („Pat-Brown-Puffer“) oder BSA enthalten, wodurch eine Absättigung möglicher Bindungsstellen erfolgt. Die Objektträger werden in den genannten Lösungen 10 bis 20 min bei RT inkubiert, dann kurz in Wasser gespült.

Die Ziel-DNA muß, um mit der Probe interagieren zu können, einzelsträngig vorliegen. Dies kann durch Einwirken einer basischen Lösung erfolgen. Dazu werden die Objektträger 10 min in 0,05 M Natronlauge (in 70%igem Ethanol, pH ca. 13) inkubiert und danach durch eine aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol, jeweils 5 min) dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Blockierungslösung „Pat Brown“ (DeRisi et al. 1997):

- 2,5 g Bernsteinsäure-Anhydrid (puffert Glasoberfläche)
- 157 ml Methyl-2-pyrrolidinone
- 17,5 ml 0,2 M Na-Borat-Puffer pH 8,0

BSA-Blockierungslösung:

- 1% BSA
- 5 x SSC
- 0,1% SDS

2.2.2.6. Aufkonzentration der Proben

Die markierte genomische DNA muß zur Hybridisierung aufkonzentriert werden, um in kleinem Volumen auf den Microarray aufgebracht werden zu können. Dies erfolgt entweder durch Fällung oder Filtrierung.

A. Alkohol-Fällung der DNA

Ansatz pro Hybridisierungsexperiment:

- 0,5 µg Cy5-markierte Referenz-DNA
- 0,5 µg Cy3-markierte Test-DNA
- Blockierungs-Agenzien:
 - 60 µg humane COT-1 DNA (sättigt entsprechende repetetive Bereiche)
 - 100 µg Hefe t-RNA (blockiert unspezifische Hybridisierungsbereiche)
 - 20 µg Poly(dA-dT)-RNA (sättigt Poly(A)-Enden der cDNAs)
- 0,05 faches Volumen 3M NaAc (pH 5,2)
- 2 faches Volumen 100% EtOH

Nach Vortexen erfolgt die Fällung für 30 min bei -80°C. Die DNA wird anschließend 15 min bei 14.920 x g zentrifugiert und mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen (15 min Zentrifugation bei 14.920 x g).

Nach dem vollständigen Trocknen der Probe wird diese im gewünschten Volumen Hybridisierungsmix (üblich sind 6-10 µl) gelöst (30 min Schütteln).

Standard-Hybridisierungsmix:

- 33% FA
- 2x SSC
- 17% H₂O dd

B. Filtrierung

Anstelle der Alkoholfällung besteht die Möglichkeit, Filtersysteme zu verwenden (z.B. Microcon-30 von Millipore), um das Volumen der Probe zu verringern und zugleich ungewünschte niedermolekulare Bestandteile zu entfernen.

Die Probenflüssigkeit wird in einen kleinen Filter gegeben, welcher in einem 2 ml-Reaktionsgefäß steht. Während der Zentrifugation dieses Systems wird die Flüssigkeit durch einen Filter im Innengefäß herausgedrückt, zurück bleiben Moleküle, welche größer als das gewählte Filternetz sind, sowie der gewünschte Rest an Flüssigkeit. Die genaue Zeit und Zentrifugationsgeschwindigkeit müssen hierbei individuell ermittelt und mehrmals kontrolliert werden.

Die Probe wird schließlich im Hybridisierungsmix (s.o.) aufgenommen und gründlich durch Schütteln gelöst.

Der nächste grundlegende Schritt ist die Denaturierung der Proben-DNA für 5 min bei ca. 90°C. In einer 30-45 minütigen Renaturierungsphase bei 37°C lagern sich Komponenten zum Absättigen an entsprechende unspezifische / repetitive Bereiche. Nach kurzem Abzentrifugieren steht die Probe zur Hybridisierung zur Verfügung.

2.2.2.7. Hybridisierung

Der Hybridisierungsmix mit Proben-DNA wird vorsichtig auf den markierten Bereich des Chips gegeben. Ein aufgelegtes Deckglas wird mit FixoGum abgedichtet. In einem Kunststoffbehälter wird der Objektträger jetzt in einer feuchten Kammer ca. 48 h im leicht schüttelndem Wasserbad inkubiert. Die Temperatur des Bades beträgt dabei 62°C.

2.2.2.8. Posthybridisierungs-Schritte

Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wird das FixoGum entfernt und das Waschen der Chips beginnt unter zunächst weniger stringenten Bedingungen. Beim ersten Waschvorgang in Lösung A1 (oder alternativ A2) muß das Deckglas vorsichtig abgespült werden. Nach zweimaligem Wechseln der Lösung (nach 5 min), folgt dreimaliges Waschen in Lösung B1 (alternativ B2).

Eine Alkoholreihe (70%, 90% und 100% EtOH, jeweils 4 min) entfernt Puffer- und Wasserreste, die Chips werden wie zuvor luftgetrocknet.

Waschlösung A1:

50% FA, 2x SSC, ph 7,0, 42°C

oder Waschlösung A2:

30% FA, 7x SSC, 0,4% SDS, 42°C

Waschlösung B1:

0,1x SSC bei 60°C

oder Waschlösung B2:

0,1x SSC, 0,01% SDS, 50°C

2.2.2.9. Messung der Signalintensitäten

Die Fluoreszenzsignale werden in einem sog. *Scanner* (Axon Instruments GenePix 4000 A, Abb. 7) ermittelt, in welchem die DNA-Chips einzeln eingelegt werden. Dieses Epifluoreszenz-Gerät verfügt über zwei Lasersysteme zur Anregung mit den Wellenlängen 532 nm (bei 20 mW) für Cy3- bzw. 635 nm (mit 15 mW) für Cy5-Signale. Zwei separate Photomultiplier-Tubes (PMT) erfassen simultan die emittierten Photonen. Zunächst kann mit einer reduzierten Auflösung von 40 µm der Bereich auf dem Objektträger gesucht werden, der die DNA-Spots enthält. Sämtliche Spots des DNA-Chips werden dann in einem einzigen Meßvorgang mit einer Auflösung von 10 µm (1 Pixel entspricht also 10 µm) erfaßt. Die Signale können durch mehrfaches Auslesen der PMT weiter verstärkt werden. Steuer- und Analysevorgänge erfolgen per Computer über das Programm Genepix (Version 3.0 von Axon Instruments).

Zur Erfassung der Einzelintensitäten wird über das gewonnene Bild des DNA-Chips ein Raster gelegt, welches schematisch die vorhandenen Spots wiederspiegelt. Dieses Raster wird möglichst präzise ausgerichtet, die Software versucht dann die einzelnen DNA-Spots zu erkennen und zu markieren. Nachbearbeitung ist jedoch meist nötig, um Position und Größe der Markierungen anzupassen und um schlechte, nicht auswertbare Signale von optisch guten zu differenzieren. Im folgenden Schritt werden die Intensitäten des gerasterten Bildes vermessen und eine Reihe von verschiedenen Meßdaten generiert. Dazu gehören unter anderen:

- Position und Durchmesser des Spots
- Mittelwert und Median für jeden Spot in beiden Kanälen
- Ratio-Wert durch Division des Test-DNA-Wertes durch den der Referenz-DNA
- Mittelwert und Median für den lokalen Hintergrund von jedem Spot in beiden Kanälen. Dabei wird ein Meßbereich des 3 fachen Durchmessers um den jeweiligen Spot (ohne die Spot-Region selbst) gemittelt.
- Werte der Spots mit subtrahiertem Hintergrund
- Standardabweichungen sämtlicher Werte

Die Daten werden in einer Datei gespeichert (*Genepix-Resultfile*, *.gpr), welche von gängigen Textverarbeitungs- und Tabellenkalkulations-Programmen gelesen werden kann.

2.2.2.10. Auswertung

Die Auswertung der generierten Daten umfaßt bei einem Matrix-CGH-Experiment unterschiedliche Punkte:

- Mittelwert- oder Median-Bildung zusammengehöriger Replikas eines Klons mit Standardabweichung
- Unterscheidung von Kontroll- und Test-Klonen und nicht auszuwertenden Reihen (Markierungen, etc.)
- Bildung eines Mittelwertes über sämtliche Kontroll-Klone und Überprüfung der Homogenität dieser Kontrollgruppe mit Hilfe statistischer T-Tests (s.u.)
- Überprüfen sämtlicher Mittelwerte der Klon-Ratios mittels T-Tests
- Normalisierung der Ratios durch Division durch den Kontrollgruppen-Mittelwert
- Darstellung der Test-Klone als (im Test-Genom) balanciert, überrepräsentiert oder unterrepräsentiert (im Verhältnis zum Referenz-Genom)

Bei der Überprüfung der Werte mit Hilfe des T-Tests wird die folgende Formel angewendet (Press 1994):

$$T = \frac{\sqrt{\overline{X_1} - \overline{X_2}}}{s} \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}}$$

mit

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^{i=n} (X_{i1} - \overline{X_1})^2 + \sum_{i=0}^{i=n} (X_{i2} - \overline{X_2})^2}{n_1 + n_2 - 2}} \times \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

und $\overline{X_{1/2}}$ = Stichproben- (Klon-) Mittelwert
 $n_{1/2}$ = Stichprobenumfang (Replika-Anzahl)

Es kann hiermit geprüft werden, ob eine Gruppe von Daten signifikant unterschiedlich von einer zweiten Gruppe von Daten ist, ob also die Null-Hypothese $Gruppe1 - Gruppe2 = 0$ widerlegt wird. Das Ergebnis obiger Formel liefert eingesetzt in eine entsprechende Tabelle (als sog. Tafelwert) in Abhängigkeit der Anzahl der Datenpunkte (Freiheitsgrade) eine Irrtumswahrscheinlichkeit α , bzw. das Niveau, auf dem die Aussage statistisch signifikant ist. Bei der Auswertung kann ein Wert für α vorgewählt werden, der mindestens erreicht werden sollte. Es kann außerdem eine Toleranz als numerischer Wert angegeben werden, der den Bereich der akzeptierten Signale erweitert. Zur verbesserten Durchführung sämtlicher Auswertungsschritte wurde zusammen mit G.Wrobel, B.Fritz und D.Göttel in der Sprache Visual Basic 6.0 (Microsoft) ein Computer-Programm entwickelt, welches auf einem „Makro-Programm“ von S.Lampel in Excel (Microsoft) basiert.

2.2.3. Expressions-Hybridisierung

Einer der Ziele eines mCGH-cDNA-Microarrays soll die Möglichkeit sein, mit der selben Art von Chip sowohl genomische Veränderungen, als auch Expressionsunterschiede von Zellpopulationen detektieren zu können.

Ziel-DNA-Präparation und Chip-Herstellung bei der Expressionshybridisierung sind identisch mit den in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen Schritten. Die Aufbereitung der Proben-DNA und die Hybridisierungsparameter wurden nach einem Protokoll von G.Wrobel durchgeführt.

Proben-Herstellung

Die eingesetzte RNA aus Herz bzw. Pankreas wird in einer Reversen Transkription zu cDNA umgeschrieben, dabei werden markierte Nukleotide eingebaut. Benutzt werden hierfür Chemikalien des *OMNI-Script*-Kits.

Der 20 μ l-Ansatz für 0,05 bis 2 μ g zu markierende RNA setzt sich wie folgt zusammen:

Oligo-d(T)-Nukleotide 0,5 μ l

Puffer	2 µl
MgCl ₂	1 µl
Reverse Transkriptase	1,5 µl
RNAse-Inhibitor	1 µl
Cy3- bzw. Cy5-dUTP	2 µl
dNTP-Mischung	0,4 µl
RNA	entsprechendes Volumen
H ₂ O	ad 40 µl Endvolumen

Die Reaktion findet über 60 min bei 37°C statt. Freie Nukleotide werden mittels Sephadex-Säulen von der markierten cDNA getrennt (s. Kapitel 2.2.1.2.).

Mit Blockierungslösung vermischt, wird die DNA mit 70% Ethanol und 0,3 M NaAc (pH 5,2) 30 min bei -80°C gefällt. Es folgen eine 20 minütige Zentrifugation (14.929 x g), sowie zwei Waschschrte mit 70% EtOH (5 min Zentrifugation bei 14.929 x g). Das Proben-DNA-Pellet wird getrocknet und in 10 µl Hybridisierungsmix aufgenommen. Nach Denaturierung der Probe durch 5 minütige Inkubation bei 75°C folgt die Absättigungsphase mit den blockierenden Agentien für 30 min bei 42°C.

Blockierungslösung:

10 µl humane COT-1-DNA
3 µl tRNA
2 µl Poly-(A)-DNA

Hybridisierungsmix:

120 µl 20x SSC
7,2 µl 20% SDS
113 µl H ₂ O
120 µl Formamid

Hybridisierung und Nachbehandlung

Die Hybridisierungsreaktion findet für ca. 24 h bei 30°C statt. Nach der Inkubation werden die Präparate dreimal je 5 min in Waschlösung A2 (s. Kapitel 2.2.2.8.) bei 42°C und dreimal in Waschlösung B2 (s. Kapitel 2.2.2.8.) bei 50°C gewaschen. Nach einer Alkoholreihe werden die Präparate getrocknet und analog zu den genomischen Hybridisierungen ausgewertet.

2.2.4. Sequenzierung

Die eingesetzten Gene, bzw. *Expressed Sequence Tags (EST)* der chromosomalen Region 13q14 werden aus pCR-XL-TOPO-Vektoren von E.coli isoliert. Um die Identität der ESTs zu verifizieren werden die DNA-Stücke beidseitig teil-sequenziert und mit gesicherten Komplet-Seqenzierungen verglichen. Zur Sequenzierung existieren die zwei klassischen Ansätze nach A.M. Maxam und W. Gilbert (Chemische Spaltungs-Methode), bzw. nach F. Sanger (Kettenabbruch-Methode). Letztere ist wegen ihrer hohen Zuverlässigkeit weiter verbreitet. Sie beruht auf statistisch verteilte Unterbrechungen während einer PCR-artigen Sequenzverlängerungs-Reaktion welche durch Zugabe von Dideoxy-Nukleotiden zu dem Gemisch normaler Deoxy-Nukleotide erreicht werden. Die ddNTPs werden als Basenanaloga in gleicher Weise in die wachsende DNA-Kette eingebaut, erlauben jedoch keine weitere Verlängerung, da ihnen die 3'-OH-Gruppe fehlt (Knippers, 1997). Es entsteht ein Gemisch aus sämtlichen möglichen Sequenz-Längen. Die weiterentwickelte Methode erlaubt heute die gleichzeitige Zugabe von vier mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten ddNTPs, sodaß die Reaktionen nicht mehr in vier Einzel-Ansätze getrennt werden müssen. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung kann jede Länge durch den angetroffenen Fluoreszenzfarbstoff mit einer der vier Basen assoziiert werden und die Basenabfolge der Reihe nach abgelesen werden.

2.2.4.1. Markierung der DNA

Für die Sequenzierung wurden Reagenzien des „Big Dye Terminator“-Kits (P.E. Applied Biosystems) benutzt.

Um die Reinheit und die damit verbundene Lesbarkeit der Sequenzierreaktion zu verbessern, empfiehlt es sich, die Menge der eingesetzten DNA in den verschiedenen Probenlösungen einander anzugleichen. Eine Konzentration von 60 µg/µl hat sich dabei als optimal herausgestellt (C.Schaffner, pers. Mitteilung). Die DNA wird daher zunächst neben einem Konzentrations-Marker in einem 1%-Agarosegel aufgetrennt und die Ansätze dann entsprechend der ermittelten Konzentrationen verdünnt, bzw. konzentriert. Das benötigte Volumen an DNA wird dann mit 4 µl Big-Dye-Mix und 0,3 µl Primer vermischt und mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt. Dabei werden 3'- und 5'-Primer in separaten Ansätzen eingesetzt.

Die Reaktion zum Einbau der markierten Nukleotide findet analog einer Polymerase-Ketten-Reaktion statt:

2 min	96 °C	(Einleitende
Denaturierungsphase)		
30 x	30 sec	96 °C (Denaturierung)
	30 sec	51 °C (Primer-Anlagerung)
	4 min	60 °C (Sequenzverlängerung)
15 min	60 °C	(abschließende Sequenzverlängerung)
dann	4 °C	(Arretierung der Enzymreaktion)

Es hat sich außerdem als vorteilhaft herausgestellt, den Temperaturanstieg (*ramp*) bei den Aufheizphasen auf 90%, bzw. 1 °C pro sec einzustellen (C.Schaffner, pers. Mitteilung).

2.2.4.2. Fällung / Konzentration der DNA

Zur Fällung der markierten DNA werden 3/10 v/v 3 M NaAc (pH 4,2) und ein 2,5faches Volumen 100% EtOH zum Ansatz gemischt und 20 - 30 min zentrifugiert (14.929 x g, bei 4 °C). Nach einem Reinigungsschritt mit 250 µl 70% EtOH wird die DNA in der SpeedVac-Zentrifuge 10 min getrocknet, um dann in 5 µl Ladepuffer mit 50% Formamid gelöst zu werden.

2.2.4.3. Vorbereitung der Sequenzier-Maschine und Gellauf

Die eigentliche Sequenzierung erfolgt in einem ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma Perkin Elmer. Am Gerät müssen einige Vorbereitungen getroffen werden. Die folgenden Arbeitsschritte wurden nach einem Protokoll von Herrn R. Klären durchgeführt.

Heizplatten und Pufferkammern werden entfernt und gesäubert. Die Glasplatten, welche später das Trenngel beinhalten, müssen aus der Halterung genommen und mit Spülmittel und Isopropanol gereinigt werden. Beim Abtrocknen ist darauf zu achten, Tücher ohne autofluoreszierende Eigenschaften zu verwenden. Die Glasplatten werden (mit der Ätzung nach außen) mit zwischengelegten Abstandshaltern aufeinandergelegt und in ihrem Rahmen fixiert. Die Gelflüssigkeit wird über eine sog. Gießhilfe mit einer Spritze eingefüllt, ein flacher Kamm wird als Abschluß auf der entgegengesetzten Seite eingelegt und mit Halterungsklammern befestigt.

Nach 45 - 60 min ist das Sequenziergel auspolymerisiert. Die Platten werden nochmals von außen gereinigt und in die Maschine eingehängt. Heizplatten und Pufferkammern müssen befestigt werden. Der Laufpuffer wird eingefüllt und mittels einer Spritze werden

die zu beladenden Gelbereiche durchspült. Jetzt kann der die Taschen definierende Spitz-Kamm aufgesetzt werden und der Gellauf am Steuercomputer eingestellt werden. Man beginnt mit einem Vorlauf von 15 min, bei dem das Gel temperiert und auf eventuelle Verunreinigungen überprüft wird. Dann werden zunächst Proben in jede zweite Tasche des Gels (bzw. des Kammes) gefüllt und der Gellauf gestartet. Nach 10 min wird unterbrochen, um die restlichen Proben in die noch freien Taschen zu laden. Die Auftrennung erfolgt nun in ca. 5 h, die Signale werden während dieser Zeit vom Computer aufgezeichnet.

Gelzusammensetzung (50 ml; 5 %iges Polyacrylamidgel / 7 M Harnstoff):

21,0 g Harnstoff (NF)

8,4 ml 30 %ige Acrylamid- Bisacrylamidlösung (29:1)

6,0 ml 10x TBE - Puffer (NF)

20,0 ml H₂O

+ 250 µl APS und 35 µl TEMED

Laufpuffer: 1x TBE

2.2.4.5. Auswertung

Das entstandene Gelbild kann auf dem Steuercomputer korrigiert werden, indem die einzelnen Farbspuren nachgezogen und Anfangs- und Endpunkte definiert werden. Das Auslesen der Signale liefert dann die gemessene Sequenzfolge als Textdatei. Die Sequenzen können mit Hilfe des Programms BLAST (Tatusova, T.A. und Madden, T.L. 1999), welches über das Internet zugänglich ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>), mit den Referenz-Sequenzen verglichen werden.