

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Hybridisierungsexperimenten mit DNA-Microarrays durchgeführt, auf welchen Zielsequenzen unterschiedlicher Komplexität immobilisiert worden waren. In Vergleichen mit Ziel-DNA aus PAC- und YAC-Klonen, sollte die Möglichkeit untersucht werden, genomische Imbalancen mittels cDNA-Fragmenten nachweisen zu können. Die Experimente waren schwerpunktmäßig auf die Analyse der humanen chromosomalen Region 13q14 ausgelegt. Aus diesem Bereich wurden verschiedene Gene als Ziel-DNA benutzt, unter anderem eine Reihe von Spleiss-Varianten des Gens BCMS (*B-cell related malinancy with multiplesplicing*), deren Identität durch eine Sequenzierung überprüft wurde. Als Hybridisierungsprobe wurde genomische DNA der Zelllinie COLO-320 und Referenz-DNA aus Plazentazellen benutzt. Das Genom der Kolonkarzinom-Linie wurde zunächst mittels einer chromosomalen CGH auf Imbalancen untersucht, welche mit der Methode der Matrix- oder Microarray-CGH bestätigt werden sollten.

3.1. Chromosomale CGH-Analyse der Zelllinie COLO-320

Um die Ergebnisse der Untersuchungen von genomischen Imbalancen mittels DNA-Microarrays beurteilen zu können, wurde zunächst eine chromosomale Vergleichende Hybridisierung (CGH) mit DNA der Zelllinie COLO-320 durchgeführt.

Die Markierung der Krebszelllinien-DNA erfolgte mit Biotin, welches dann durch mit FITC-konjugierte Avidin-Moleküle detektiert werden konnte. Die Referenz-DNA, welche aus peripherem Blut einer gesunden Probandin stammte, wurde mit Digoxigenin markiert und mit Rhodamin-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen. Durch diese indirekte Nachweismethode konnte eine Signalamplifikation erreicht werden. Man ist hierdurch ferner relativ flexibel in der Wahl der Fluorochrome. Beispielhaft sind in Abbildung 7 Fluoreszenzbilder und eine geordnete Metaphase-Spreitung gezeigt.

Ausgewertet wurden die Chromosomensätze von 16 Zellen. Dabei war es wichtig, solche Spreitungen zu finden, deren Chromosomen einzeln und möglichst vollständig sichtbar waren und die sich von anderen Spreitungen in der Nachbarschaft deutlich abtrennten. Mittelwerte über sämtliche ausgewertete Chromosomen ergaben das in Abbildung 8 gezeigte CGH-Profil der Zelllinie. Die angegebenen unterschiedlichen Chromosomenzahlen ($n = 26$ bis 31) ergaben sich durch z.T. nicht zuzuordnende oder fehlende Chromosomen. Ein Verlauf des Profils entlang der Mittellinie entspricht dem Ratio von 1, also dem balancierten Zustand zwischen Test- und Referenz-Genom. Eine Abweichung um mindestens eine Einheit nach rechts entspricht einem Zugewinn im Test-

Genom mit einem Ratio $\geq 1,25$, eine entsprechende Abweichung nach links zeigt einen Verlust im Tumor-Genom ab einem Ratio kleiner oder gleich 0,75.

Folgende Überrepräsentationen konnten in der analysierten Zelllinie COLO-320 detektiert werden:

- 2p11 – p25
- 2q12 – q22
- 8q23 – q24
- 9q31 – q34
- 10p12 – p13
- 11p15
- 12p11 – p12
- 12q23
- 13q
- 17q

Imbalancen zentromeren Bereichen wurden nicht gewertet, da diese Regionen bekanntermaßen zu falsch positiven Ergebnissen führen können, deren Ursachen ausführlich diskutiert wurden (z.B. Lichter et al 1995).

Wichtig für vergleichende Experimente mit Microarrays war die Überrepräsentation des chromosomalen Bereiches 13q14, der schwerpunktmäßig untersucht wurde, die starke Amplifikation des *cMYC*-Locus bei 8q24, die als Positiv-Kontrolle diente, sowie der balancierte Status des Bereiches 11q22, in dem das Gen *ATM* lokalisiert ist, welches als Kontrolle auf den DNA-Chips genutzt werden sollte.

A.

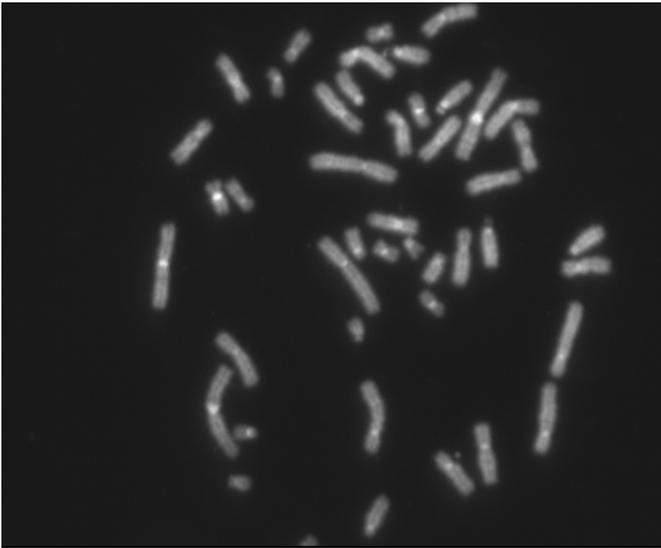
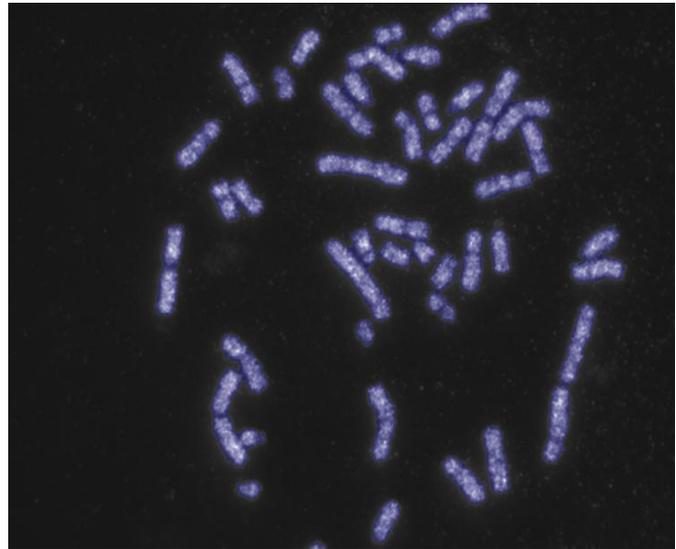
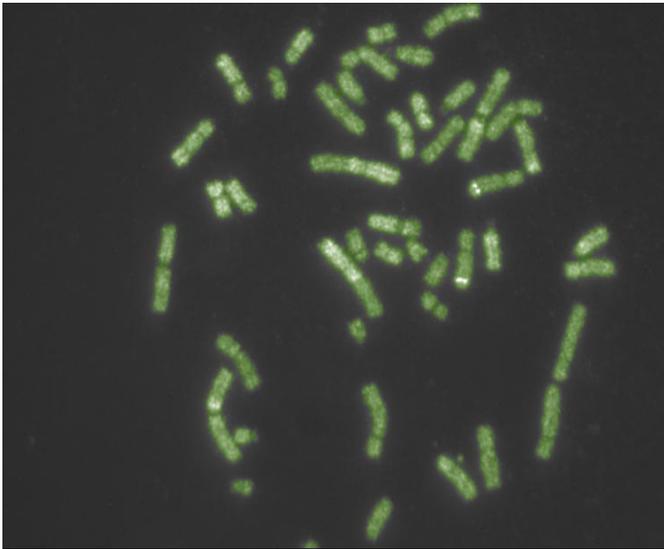


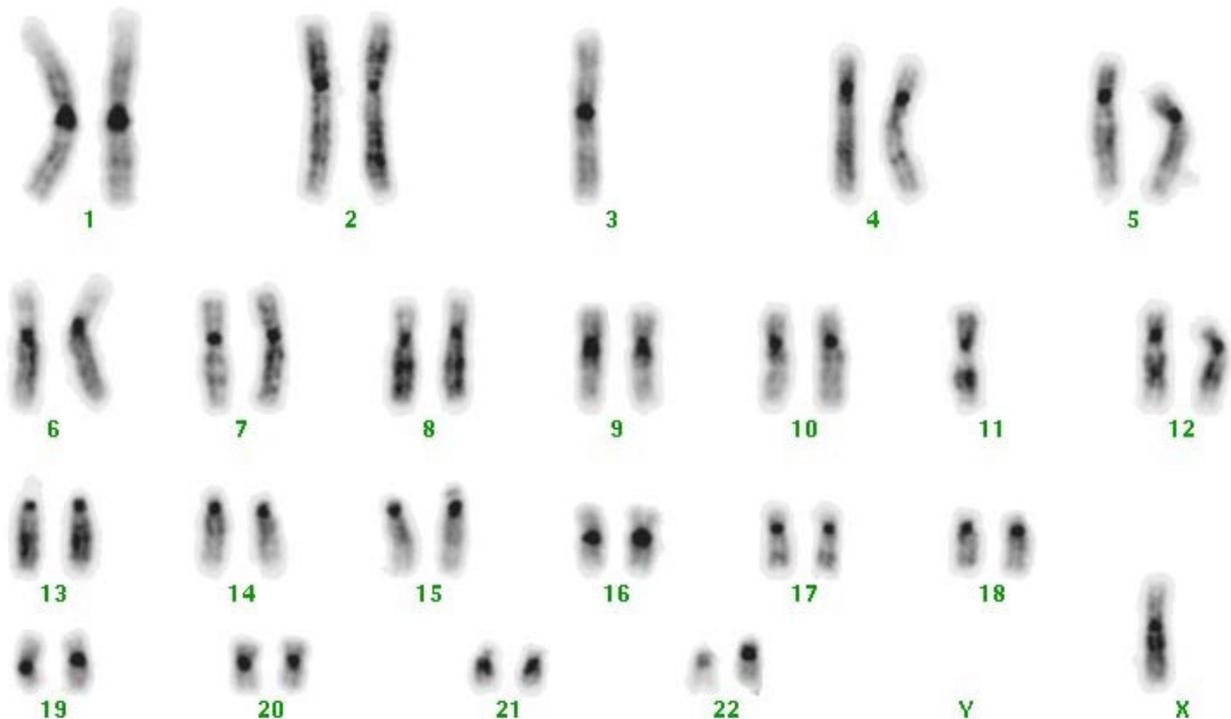
Abb. 7: Chromosomale CGH der Zelllinie COLO-320

A. – C. (Falschfarben-) Fluoreszenz-bilder der unterschiedlichen Kanäle:
A. DAPI, B. FITC, C. TRITC
D. Karyogramm einer Metaphase:
Negativ-Bild der DAPI-Färbung (ähnlich der G-Bänderung), welches zur Identifikation der Chromosomen benutzt wurde.

B.

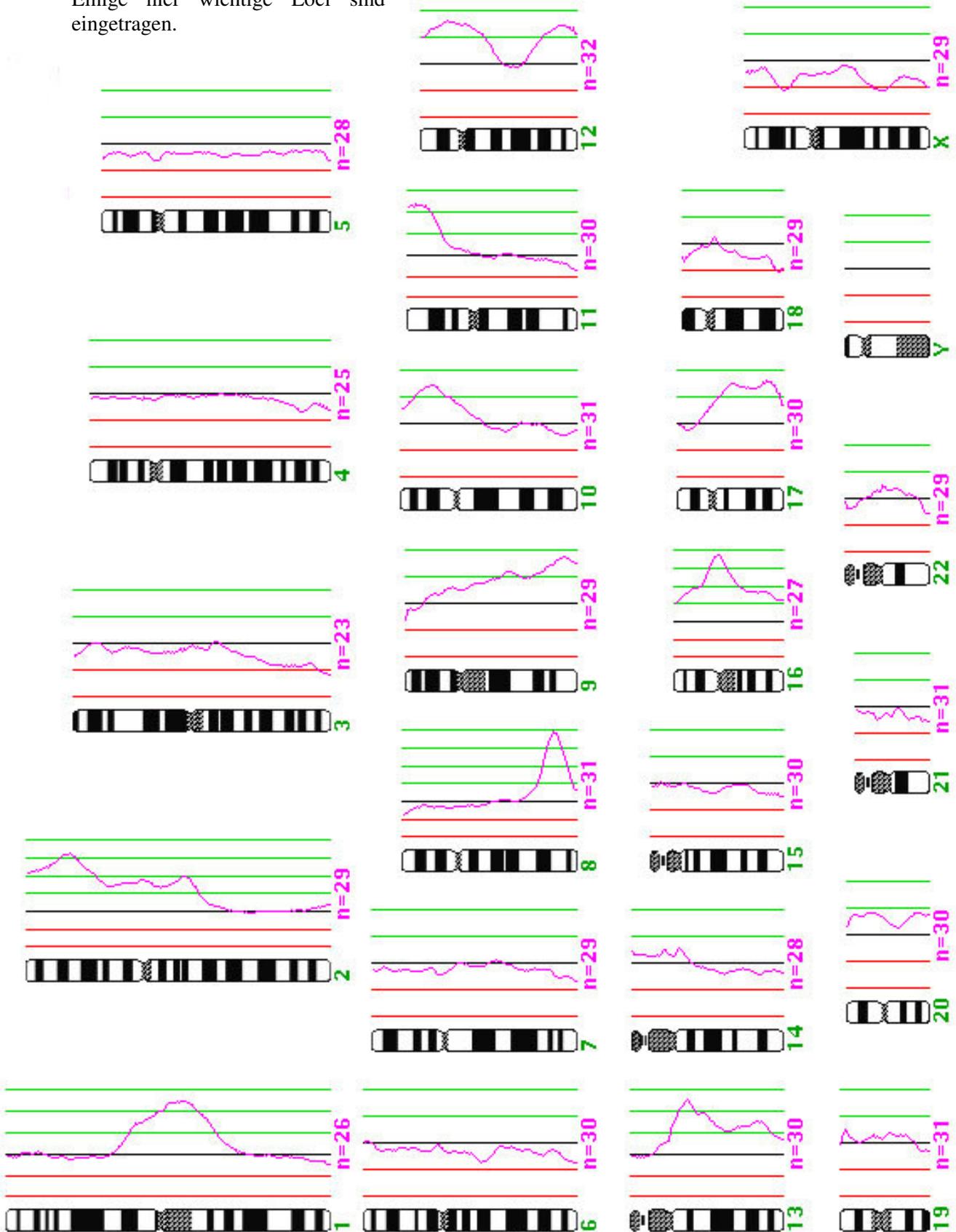


D.



Gemittelte Werte der Chromosomen 1 bis X über n unterschiedliche Chromosomen. Einige hier wichtige Loci sind eingetragen.

Abb. 8: CGH-Profil der Zelllinie COLO-320



3.2. Sequenz-Überprüfung der cDNAs

Um Aussagen mit Hilfe von DNA-Microarrays zu ermöglichen, ist es unerlässlich die Identität jedes Hybridisierungszieles auf einem Chip eindeutig identifizieren zu können. Hierfür ist neben einer präzisen Arbeitsweise eine genaue Buchhaltung wichtig. Bei DNA-Chips mit mehreren hundert bis tausend Zielstellen ist die Erfassung und Verfolgung der eingesetzten Molekül-Lösungen nur noch mittels elektronischer Datenbanken möglich (*Sample tracking*).

Im Vorfeld muß bereits die biologische Identität der DNA-Abschnitte überprüft werden. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten cDNA-Sequenzen des chromosomalen Bereiches 13q14 war dies besonders wichtig, da es sich um unterschiedliche Spleiss-Varianten des Gens BCMS handelte, die vor kurzer Zeit erstmals beschrieben wurden (S. Wolf, pers. Mitteilungen). Es wurde daher eine Sequenzierung der in Plasmiden klonierten DNA-Abschnitte vorgenommen.

Die Abfolge der beidseitig ansequenzierten DNA-Fragmente war über ca. 1000 Basen gut lesbar und konnte mit zurückliegenden Sequenzierreaktionen verglichen werden. Das Auftreten der für die einzelnen Spleiss-Varianten charakteristischen Exon-Abfolgen wurde anhand von Untersuchungen von Herrn S. Wolf überprüft (Wolf 2000). Die Identität der benutzten Klone konnte dadurch verifiziert werden. Zum Sequenz-Vergleich wurde das *BLAST-2-Sequences-Programm* (Tatusova und Madden 1999) verwendet, welches über das Internet zugänglich ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>). Das Programm arbeitet mit einem Algorithmus des paarweisen Vergleichs (*pairwise alignment*) zweier Sequenzabfolgen, um Aussagen über deren Ähnlichkeit zu ermöglichen. Als Ergebnis wird dann – in Abhängigkeit von den gewählten Programmparametern – keine Homologie oder eine Homologie mit einer Prozentzahl assoziiert geliefert, welche den Grad der Übereinstimmung der beiden verglichenen Sequenzen charakterisiert.

Die errechneten Identitäten sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Die Bezeichnungen der Klone, bzw. der DNA-Sequenzabschnitte sind in Tabelle 9 des Abschnitts 3.4. erläutert. Die Sequenzierungsergebnisse sind jeweils als 5'- und als 3'-Sequenzierung genannt. Eine eindeutige Identifizierung des Klons war genau dann gegeben, wenn beide zugehörigen Basenabfolgen der bekannten zu erwartenden Abfolge der Exons entsprach. Auch diese Exonfolgen sind in Tabelle 9 im Abschnitt 3.4. mit den Klonen genannt.

Tab. 8: *BLAST-2-Sequences*-Homologiewerte der sequenzierten Spleiss-Varianten von BCMS, welche als cDNA-Abschnitte auf die Microarrays aufgebracht wurden

Klon-Bezeichnung	Verifizierbarkeit	Ungefähre Länge der lesbaren Sequenz [Nukleotide]	Positiv überprüfte Exons / Homologie-Grad	Überprüfte Exons ohne Homologie
W1 5'	+	980	Leu1 / 100% 53 / 98% 17a / 97% 8 / 100%	6e 16 18a
W1 3'	+	740	19 / 94% 18a / 95% 17a / 93%	22b 16 8
W3 5'	+	1210	Leu1 / 96% 53 / 98% 8 / 100% 17a / 97%	
W3 3'	+	1200	22a / 99% 19 / 78%	17a 18a 22b
W4 5'	+	890	Leu1 / 96% 53 / 100% 6e / 100% 17a / 92% 17a.2 / 85%	
W4 3'	+	950	19 / 100% 17a.2 / 100%	
W5 / 6 5'	-	1300	22a / 98%	22b, 20, 18a, 17a, 16, 7b.2 6b.1, 53
W5 / 6 3'	-	1300	Leu1 / 99%	6b.2, 17a, 18a 22a, 22b, 53
W7 5'		1010	Leu1 / 98%	
W7 3'	+	950	22a / 98% 18a / 93% 17a / 86%	16
W9 5'	+	1270	Leu1 / 99% 53 / 98% 8 / 98% 16 / 91%	
W9 3'	+	1170	22a / 98% 19 / 82%	22b 53
W10 5'	+	1110	Leu1 / 96% 53 / 98% 16 / 95%	17a
W10 3'	+	1130	22a / 100% 19 / 94% 17a / 98%	20, 16 8, Leu1, Leu2
W17 / 19 5'	+	940	Leu1 / 86% Leu2 / 86%	53, 8
W17 / 19 3'	-	1240		22b, 19, 14, 9 8, Leu2, 53, Leu1

W22 5'	+	1210	9 / 96% 10 / 99% 12b / 85%	
W22 3'	-	1150		22b, 18d 9, Leu1
W46 5'	+	1200	9 / 98% 12a / 92% 11a / 100% 11b / 100%	12b 10
W46 3'	-	1350		22a, 18 14, 13, 9
W53 5'	+	1340	11a / 97% 11b / 85% 10 / 98% 9 / 99%	13
W53 3'	-	1300		18d, 14, 12a 11a, 10, 9, 8

Die Klonbezeichnungen sind in Tabelle 9 in Abschnitt 3.4. erläutert. Konnte die gefundene Sequenz der erwarteten Exonfolge der jeweiligen Spleiss-Variante über positive, bzw. Ausschluß-Kontrolle zugeordnet werden, so befindet sich ein + bei der Verifizierbarkeit, andernfalls ein -.

Beim Vergleich wurde die *blastn*-Programmvariante gewählt, als Programmparameter wurden die Folgenden gewählt:

Punkte für Übereinstimmungen: 1 Strafe für Lückenverlängerungen: 2
 Strafe für Nicht-Übereinstimmungen: 2 Mindestübereinstimmung: 10
 Strafe für Lücken: 5 Mindestlänge: 11

Von den auf Microarrays benutzten Sequenzabschnitten (zwei Klone hatten gleiche humane DNA-Fragmente) konnten 5 sowohl über ihr 5'- als auch das 3'-Sequenzierungsergebnis und 4 über die 5'-Sequenzierung identifiziert werden.

Die humane DNA in den Klonen 5 bzw. 6 (identische Insertionen) konnte nicht mit Sicherheit mit den bekannten Sequenzen abgeglichen werden.

Die Sequenzierung sämtlicher Klone wurde wiederholt, erbachte jedoch keine weiteren Erkenntnisse.

3.3. Bestimmung experimenteller Parameter

3.3.1. Stabilität der Fluoreszenzsignale von Cy3 und Cy5

Die Signalintensität, die auf den Microarray gemessen werden kann, ist die zentrale Datenquelle aller Experimente. Zu geringe Fluoreszenz-Intensitäten führen zu nicht aussagekräftigen Ergebnissen. Fluoreszenzsignale sind jedoch beeinflussbar durch eine Reihe von Parametern, von denen einer der Effekt des Ausbleichens (*bleaching* oder *photodestruction*) ist. Es kommt hierbei zu einer Fluoreszenzauslöschung, da der angeregte Zustand der Fluorochrom-Moleküle wesentlich reaktiver ist als der Normalzustand. Moleküle treten in Wechselwirkung und verlieren oder verringern dabei ihre Fluoreszenzeigenschaft. Dieses Ausbleichen stellt eine charakteristische Größe der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe dar und folgt bei durchgehender Bestrahlung der Gleichung:

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda * t \quad \text{mit} \quad \lambda = \text{Charakteristischer Bleichungs-Faktor des Fluorochroms}$$

t = Zeit

$$\Rightarrow N(t) = e^{(-\lambda * t)}$$

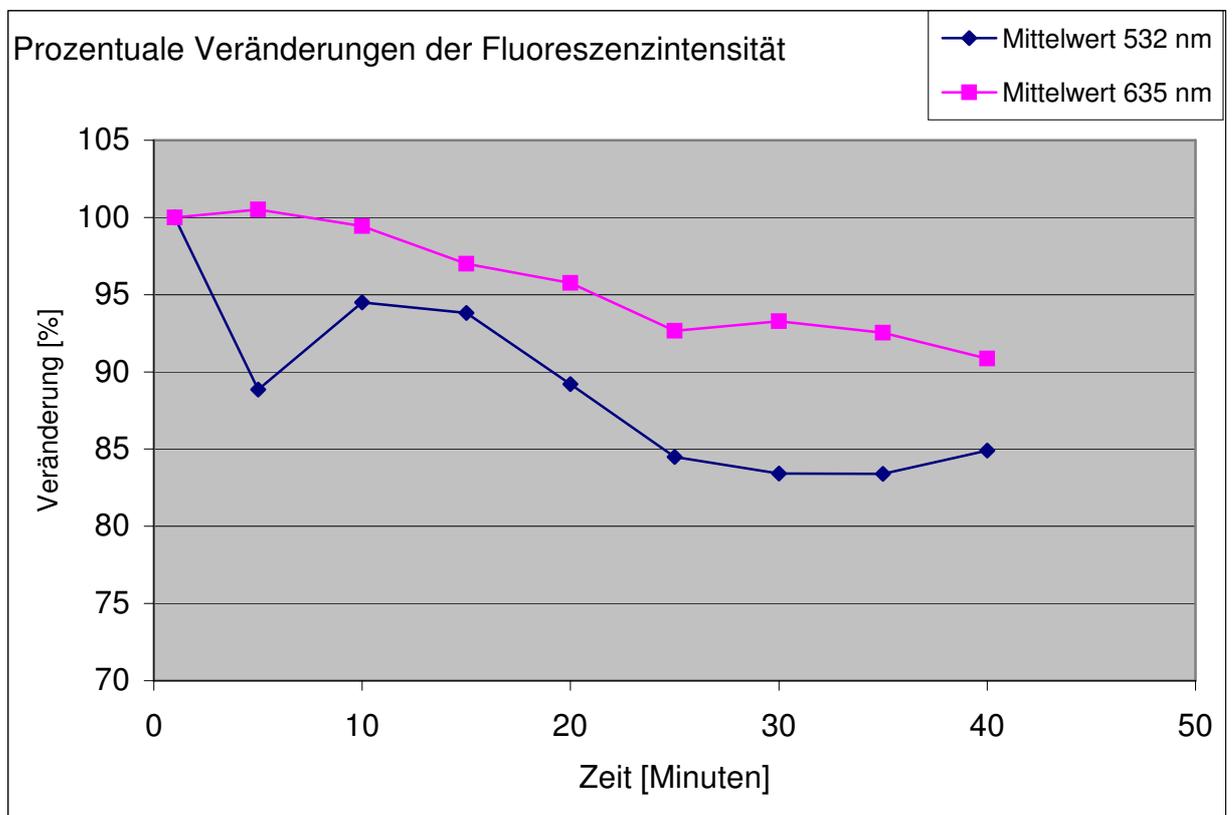
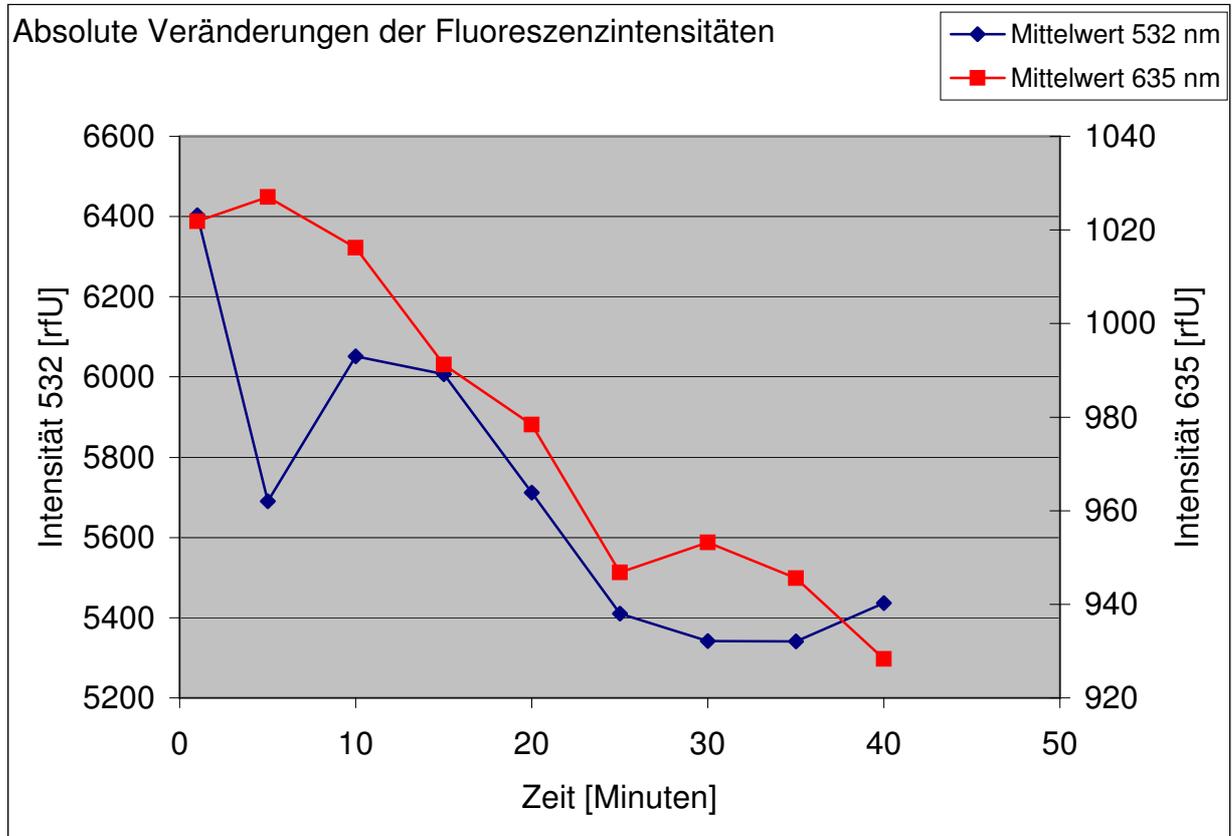
N = Mittlere Intensität

Die Stabilität des Fluoreszenzsignals wurde in einer Meßserie über 40 min beobachtet. Eine Reihe von 12 hybridisierten DNA-Zielstellen wurde alle 5 min gescannt und aus den mittleren Intensitäten der Einzelspots in den beiden Kanälen (532 nm und 635 nm) jeweils Mittelwerte gebildet. Diese Daten sind in Diagramm 1 als absolute Intensitäten, sowie in Diagramm 2 als prozentuale Veränderungen gegenüber dem ersten Meßwert dargestellt. Zu beachten ist hierbei, daß keine durchgehende Bestrahlung erfolgte, das Präparat befand sich zwischen den Messungen in der Dunkelheit.

Es wurde deutlich, daß eine Reduzierung der Signalintensität erfolgte, die prozentuale Abnahme mit 9% (635 nm-Signal) bzw. 15% (523 nm-Signal) jedoch relativ gering war. Die Farbstoffe Cyanin5 und Cyanin3 sind als verhältnismäßig stabil einzuordnen und sind daher für die Anwendung auf Microarrays sehr gut geeignet. Entscheidend für die Wahl der Farbstoffe ist generell auch, daß die Fluoreszenzeigenschaft im trockenen Zustand überhaupt erhalten bleibt, und daß sich die Bereiche der Emissionswellenlängen nicht oder nur wenig überschneiden.

Für die folgenden Microarray-Experimente wurde ausschließlich eine Markierung der DNA mit den beiden Farbstoffen Cy3 und Cy5 gewählt.

Diagramme 1 und 2: Absolute, bzw. prozentuale Veränderungen der Fluoreszenzintensität in den beiden Kanälen über mehrere Meßvorgänge

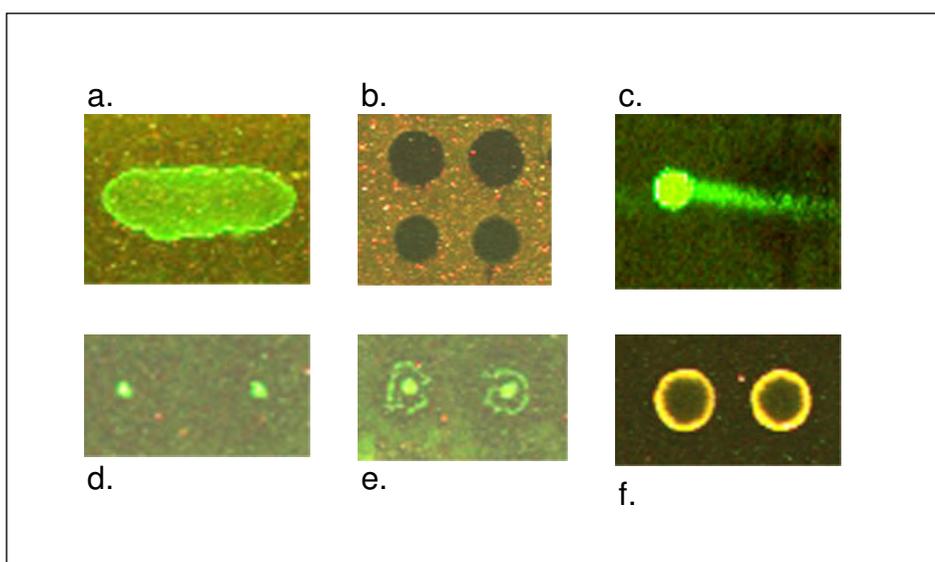


3.3.2. Morphologie der DNA-Spots

Ein großer Vorteil der Matrix-basierten CGH-Methode ist die Möglichkeit der Automatisierung von Teilschritten. Die Bildverarbeitungs-Software, mit der die gescannten Bilder der Microarrays analysiert werden, kann halb-automatisch die DNA-Zielstellen (*Spots*) erkennen, um dann die Intensitäten dieser Bereiche zu ermitteln. Um eine optimale Erkennungsrate - und damit möglichst wenig Benutzereingriffe - zu erlauben, müssen die Spots eine hohe Signal-zu-Hintergrund-Intensität aufweisen. Sie sollten jedoch auch möglichst homogen sein und einer einheitlichen Form entsprechen. Je nach Protokoll sehen hybridisierte Microarrays jedoch unterschiedlich und oftmals sehr inhomogen aus. Eine verlässliche Auswertung und auch die wünschenswerte Standardisierung zum Vergleich unterschiedlicher Hybridisierungs-Experimente verlangt daher die Analyse der zu beobachtenden Morphologien.

Abbildung 9 zeigt Spot-Morphologien, die im Verlauf verschiedener Hybridisierungsexperimente häufig auftraten und die zu Problemen bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse führen können und im Folgenden beschrieben werden. Die Ratio-Bilder wurden nach der Hybridisierung mit dem Fluoreszenz-Scanner aufgenommen.

Abb. 9: Ausschnitte aus original Ratio-Bilder als Beispiele unterschiedlicher Spot-Morphologien. Eine nähere Beschreibung und Erklärung folgt.



A. Verlaufene Spots

Die Replikas einer Klonreihe sind nicht mehr deutlich voneinander differenzierbar, der lokale Hintergrund kann nicht korrekt berechnet werden. Ursache kann eine zu hohe Luftfeuchtigkeit während des Aufbringens der Ziel-DNA, eine zu geringe Salzkonzentration der Ziel-DNA-Lösung oder ein zu gering gewählter Abstand der Replikas sein.

B. „Schwarze Löcher“

Befindet sich viel Fluoreszenz als Hintergrund um einen *Spot* herum, so erscheinen die Ziel-DNA-Stellen selbst als dunkle Bereiche. Hier hat eine stärkere unspezifische Bindung an der Oberfläche als eine spezifische Hybridisierung im Bereich der *Spots* stattgefunden. Die Zielstellen können zwar selten automatisiert vom Bildverarbeitungsprogramm erkannt, die Intensitäten jedoch teilweise noch verglichen werden. Eine Hintergrund-Korrektur würde hier jedoch negative Intensitätswerte produzieren.

C. „Kometenschweife“

Seltener kommt es zu einem bogenförmigen Verwischen von einzelnen *Spots*. Zuverlässige Intensitätswerte sind hier nur noch mit einer Software, die dynamische Spotformen zulässt, messbar. Ursachen dieser Erscheinung sind nicht bekannt, teilweise könnte es sich um mechanisches Verwischen nicht-getrockneter *Spots* handeln.

D. Verkleinerte Spots

Eine erhöhte Salzkonzentration in der Ziel-DNA-Lösung ist die Ursache für eine Fokussierung der Fluoreszenz auf einen kleineren Bereich.

E. „Spiegelei“-Spots

Zusätzlich zu einem kleinen Mittelbereich kommt es hier in einer Art des „Kaffee-Rings“ am Rande des *Spots* zu einer Ansammlung von Fluoreszenzmolekülen. Hier kann es problematisch werden, den zu messenden Bereich zu bestimmen.

F. „Kaffee-Ringe“

Ein Großteil der Fluoreszenz ist am äußeren Rand des *Spots* zu messen, im Innenbereich fällt die Intensität fast bis auf das Hintergrundniveau ab. Als Ursache kommt einerseits eine nicht ausreichende Flüssigkeitsmenge in der Kapillarnadel beim Aufbringen der DNA in Betracht; das Reservoir ist nicht gefüllt, die Lösung läuft lediglich von Rand der Nadel ab. Andererseits kann es an einem zu lang dauernden Trocknungsprozeß der *Spots* liegen, bei dem sich die Fluoreszenz-Moleküle im Randbereich sammeln. Dies wäre durch die physikalische Beschreibung des Verdunstungsvorganges einer Flüssigkeits-Halbkugel auf einer Oberfläche zu erklären.

Während zu Beginn der Studie der Auftrag der Ziel-DNA mit in Wasser gelösten Nukleinsäure-Molekülen erfolgte, wurde dann aufgrund der verbesserten Spot-Morphologie das Aufbringen in 2fach, bzw. 3fach SSC vorgenommen.

3.4. Herstellung der DNA-Microarrays

Die DNA-Fragmente, die als Hybridisierung-Ziele auf den Objektträgern dienen, wurden mittels PCR (cDNAs), ALU-Long-Range-PCR (YACs), bzw. Maxi-Präparation (PACs) hergestellt und aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.2.1.). Ihre Identität und Konzentration wurden durch Auftrennung in Agarosegelen überprüft. Die genutzten Fragmente sind in den Abbildungen 10 bis 12 nach der elektrophoretischen Auftrennung dargestellt. Die Bezeichnungen der Hybridisierungs-Zielstellen sind in Tabelle 9 in Abschnitt 3.4. des Anhangs erläutert.

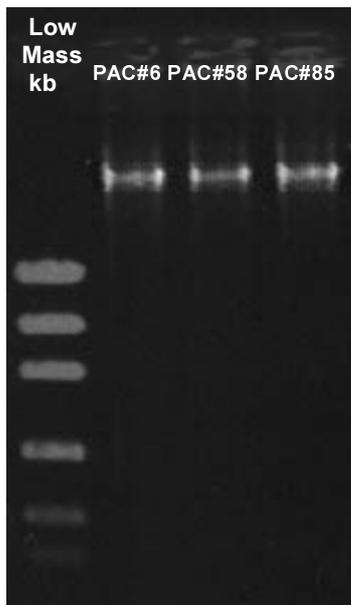


Abb. 10: Genomische DNA-Zielstellen: PACs
Drei Beispiele von PAC-Sequenzen, die aus E.coli isoliert und aufgereinigt wurden
Spur 1: Low Mass Konzentrationsmarker
Spur 2-4: PAC 6, 58 und 85

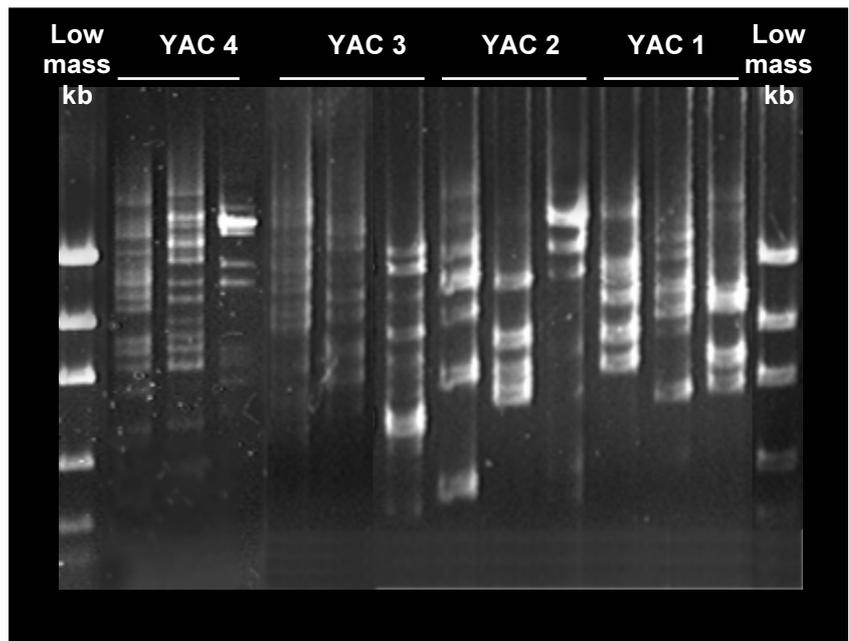


Abb. 11: Genomische DNA-Zielstellen: YACs
Vier YAC-Sequenz-Gruppen, die mit je drei unterschiedlichen Primern in einer ALU-Long-Range-PCR amplifiziert wurden
Spur 1 & 14: Low Mass Konzentrationsmarker
Spur 2-4, 5-7, 8-10 und 11-13: YAC 4, YAC 3, YAC 2 und YAC 1

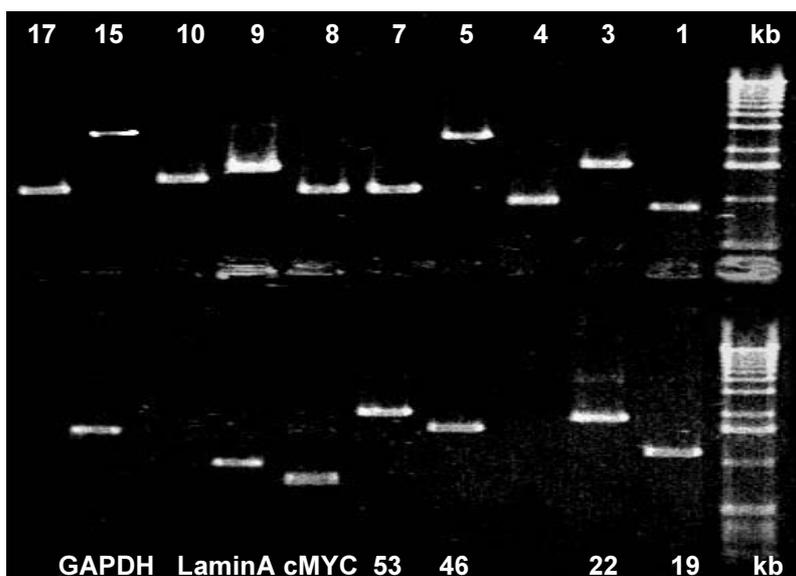


Abb. 12: cDNA-Zielstellen
PCR-amplifizierte cDNAs der
chromosomalen Region 13q14
und drei weitere ausgewählte
cDNAs;

Spur 1-10 oben: Spleiss-
Varianten 17-1

Spur 2, 4 und 5 unten: GAPDH,
LaminA und cMYC-cDNA

Spur 6,7,9 und 10 unten:
Spleiss-Varianten 53-19

Spur 11 oben und unten: 1-kb-
Leiter

Die Nummern 1 bis 53
entsprechen den
Klonbezeichnungen, W1 - W53
die in Tabelle 9, Abschn. 3.4.
erläutert werden

Die mit den beschriebenen Ziel-Sequenzen hergestellten DNA-Chips sind in den Abbildungen 13.1 bis 13.6 mit den jeweiligen Zielstellen dargestellt. Die hier gezeigten Arrays zeigen den nicht-hybridisierten Zustand und sind Ratio-Bilder, die mit Hilfe des Axon-Scanners aufgenommen wurden. Die teilweise sehr intensive Fluoreszenz geht auf Salze in den aufgetragenen DNA-Lösungen zurück und wird hier ausschließlich zur Dokumentation der Chip-Komposition verwendet.

Die Arrays 1 bis 4 wurden mit in Wasser gelösten Ziel-Sequenzen hergestellt. Auf Array 5 beinhaltet der *Spotting*-Puffer 3fach konzentriertes SSC und Array 6 wurde mit 2fach konzentriertem SSC produziert (vgl. Abschnitt 2.2.2.4.).

Die DNA-Zielstellen sind in Tabelle 9 aufgelistet. Hier sind auch die Exonkombinationen der untersuchten Spleiss-Varianten des Genes BCMS genannt.

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Ziel-DNAs der Microarrays

Nr.	Name	Kompletter Name / Beschreibung (und Exon-Kombination der Spleiss-Varianten von BCMS)	Größe [kbp]	Chromosomale Lokalisation	Repräsentation in COLO-320 (gemessen durch cCGH) **
Spleiss-Varianten von BCMS (13q14) als cDNA-Ziele					
1	W 1	leu1f-3 / CRF 19rev K5 thermoRT Pancreas (leu1/17/18/19)	0,9	13q14	+
2	W 3	leuf5II / K22 end r2 K5 thermoRT Pancreas (leu1/53/8/16/17a/18a/19/22b)	1,5	13q14	+
3	W 4	leuf5II / K22 end r2 K6 thermoRT Pancreas (leu1/53/17a/?/19)	1	13q14	+
4	W 5	leuf5II / K22 end r2 EHEB K1/K2 (leu1/6b.2/17a/18a/19/22a)	2,3	13q14	+
5	W 6	leuf5II / K22 end r2 EHEB K1/K2 (leu1/6b.2/17a/18a/19/22a)	2,3	13q14	+
6	W 7	leuf5II / K22 end r2 Granta K1/K2 (leu1/53/16/17a/18a/22a)	0,9	13q14	+
7	W 8	leuf5II / K22 end r2 Granta K1/K2 (leu1/53/16/17a/18a/22a)	0,9	13q14	+
8	W 9	leuf5II / K22 end r2 JVM2 K1/K2 (leu1/53/8/16/17a/19/22a)	1	13q14	+
9	W 10	leuf5II / K22 end r2 JVM2 K1/K2 (leu1/53/8/16/17a/19/22a)	1,3	13q14	+
10	W 15	e26f / Ap2 (unbek.)	3	13q14	+
11	W 17/19	lig8 / K19 (leu1/leu2)	1,3	13q14	+
12	W 22	K22 (9/10/11a/11b/12a/16/ 19/22a/22b)	1,2	13q14	+
13	W 46	K46 (9/11a/11b/12a/12b/ 13/14)	1,4	13q14	+
14	W 53	K53 (9/10/11a/11b/13/15/16/17a/18a/18b/18c/18d)	1,7	13q14	+
15	W pool	Kombination verschiedener cDNAs unterschiedlicher Zusammensetzungen. Die Pools werden jeweils bei Bedarf erläutert	n.a.	13q14	+
weitere Gene des Bereiches 13q14 als cDNA-Ziele					
16	RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>	1,2	13q14.1–q14.2	+
17	CHC1L	<i>Chromosome condensation 1-like</i>	1,4	13q14.3	+
18	Karyo / KPN-3	<i>Karyopherin alpha 3 (Importin alpha 3)</i>	1,6	13q14.3	+
19	DGN	<i>DGN1 = Leu5</i>	1,2	13q14	+
20	t4	<i>t4 = BCSUN (B-cell rel. malign. with multiple splicing - upstream neighbour)</i>	1,7	13q14	+
21	Promotor	Promotor-Region (mit CpG)	0,9	13q14	
22	Gene pool	Kombination verschiedenen dieser cDNAs	n.a.	13q14	+

Fortsetzung

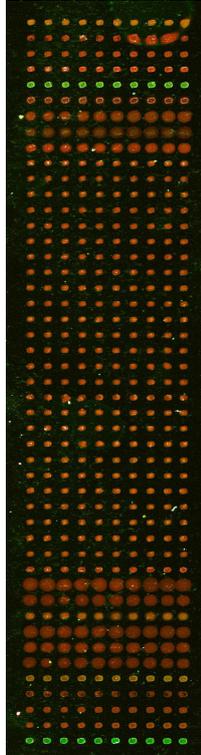
Nr.	Name	kompletter Name / Beschreibung	Größe [kbp]	Chromosomale Lokalisierung	Repräsentation in COLO-320 (gemessen durch cCGH) **
PAC-DNA-Ziele					
23	PAC 6	13q #6	ca.100	13q	+
24	PAC 19	21q #19	ca.100	21q	0
25	PAC 58	13q #58	ca.100	13q14	+
26	PAC 85	8q#85 myc	ca.100	8q24	+
27	PAC 755	11q755 11	ca.100	11q	0
28	PAC ATM	<i>Ataxia telangiectatica mutated</i>	ca.100	11q22	0
YAC-DNA-Ziele					
29	YAC1	YAC 928 f 12	n.a.	6p	0
30	YAC2	YAC 908 f 12	n.a.	7p	0
31	YAC3	YAC 933 e 9	n.a.	13q14	+
32	YAC4	YAC 908	n.a.	11q22	0
cDNA-Ziele von Loci mit bekannten Repräsentationen					
33	Lamin	<i>Lamin A</i>	0,8	1q21.2	0
34	GAP	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>	1,3	12p13.1-p13.31	0
35	cMYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	0,7	8q24.12-q24.13	+
36	ATM 4	<i>Ataxia telangiectatica mutated</i> , Anfangs-Exon	1,3	11q22	0
37	ATM 8	<i>ATM</i> , End-Exon	1,6	11q22	0
38	ATM pool	Pool: ATM4 & 8	n.a.	11q22	0
Kontroll-Zielstellen					
39	CC	Nick Translation-markierte humane Gesamt-DNA [0,01 µg/µl]; Cy3 bzw. Cy5	n.a.	n.a.	n.a.
40	CC	Kalbsthymus-DNA	n.a.	n.a.	n.a.
41	CC	Lambda-DNA	n.a.	n.a.	n.a.
42	bs PHE	<i>Bacillus subtilis</i> -Gen des Phenylalanin-Stoffwechsels	n.a.	n.a.	n.a.
43	bs TRP	B.s.-Gen des Tryptophan-Stoffwechsels	n.a.	n.a.	n.a.
44	bs DAP	B.s.-Gen des Diaminophenyl-Stoffwechsels	n.a.	n.a.	n.a.
45	bs LYS	B.s.-Gen des Lysin-Stoffwechsels	n.a.	n.a.	n.a.
46	CC	unmarkierte humane genomische DNA	n.a.	n.a.	0
47	CC	0,04% SDS	n.a.	n.a.	n.a.
48	CC	humane Cot1-DNA	n.a.	n.a.	0

* Die Exonkombinationen der Spleiss-Varianten wurden von S.Wolf ermittelt und werden hier zur Unterscheidung der unterschiedlichen Klone genannt (vgl. Wolf 2000).

** Ein + entspricht einer Überrepräsentation im Genom der Tumor-Zelllinie, eine 0 einem balancierten Zustand

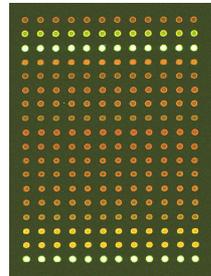
Abb. 13: Darstellung der hergestellten DNA-Microarrays mit ihren Ziel-Stellen

Array 1: „Big-Start“



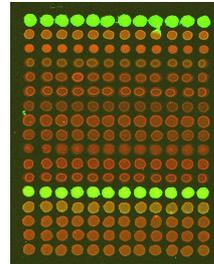
1	Cy3-DNA
2	Kalbs thymus
3	total human
4	0,05% SDS
5	human COT-1
6	PAC 6
7	PAC 19
8	PAC 58
9	PAC 85
10	PAC 755
11	PAC ATM2
12	W 1
13	W 3
14	W 4
15	W 5
16	W 6
17	W 7
18	W 8
19	W 9
20	W 10
21	W 15
22	W 17
23	W 19
24	W 22
25	W 46
26	W 53
27	W pool 1/3/22
28	W pool 5/15 17
29	W pool 10/46/53
30	W pool 4/7/9
31	cDNA RB1
32	cDNA CHC11
33	cDNA Karyopherin
34	cDNA DGN1 (t5)
35	cDNA pool
36	cDNA ATM 2 #4
37	cDNA ATM 2 #8
38	cDNA pool ATM2
39	cDNA Lamin A
40	cDNA GAPDH
41	cDNA cMyc
42	cDNA Promotor
43	Cy3-DNA
44	Kalbs thymus
45	total human
46	0,05% SDS
47	human COT-1
48	cDNA t4
49	Lambda-DNA
50	Cy5-DNA

Array 2: „Concentration“



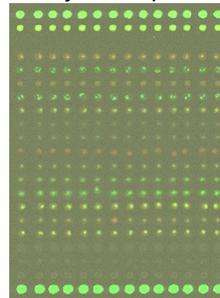
1	cMYC
2	GAP
3	Cy3
4	PAC 19
5	Pool (je 125)
6	W 5 125 ng/ul
7	W 5 250 ng/ul
8	W 5 500 ng/ul
9	W 3 125 ng/ul
10	W 3 250 ng/ul
11	W 3 500 ng/ul
12	W 3 800 ng/ul
13	W 1 125 ng/ul
14	W 1 250 ng/ul
15	W 1 500 ng/ul
16	Lam da
17	COT1
18	Cy3

Array 3: „Combination“



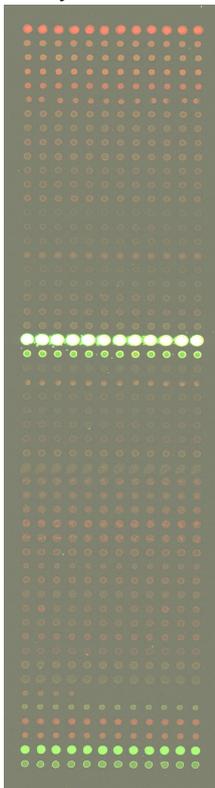
1	Cy3-Colo DNA
2	COT-1
3	Lamda
4	W 1 500 ng/ul
5	W 1 250 ng/ul
6	W 1 125 ng/ul
7	W -Pool (1,3,5)
8	W -Pool (1,3,4,5,7,9,10,22,46,53)
9	W -Pool (6,7,8,9,15,53)
10	PAC 19
11	YAC 1
12	cMyc
13	Cy3-Colo DNA
14	bs PHE
15	bs TRP
16	bs DAP
17	bs LYS

Array 5: „Hope“



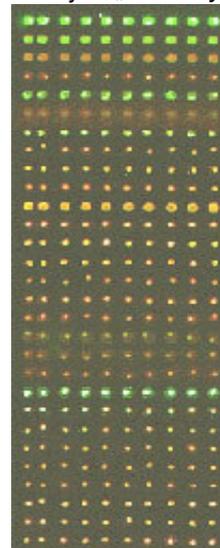
1	Cy3
2	COT
3	total human
4	cDNA cMyc
5	PAC 85
6	PAC 755
7	PAC ATM
8	cDNA ATM
9	YAC 2
10	YAC 3
11	YAC 4
12	Pool1 (1,3,4,5,6,7,9,Karyo)
13	Pool2 (1,3,4,5,6,7,9,10,15,17,22,46,53, Rb, Karyo)
14	Pool3 (1,3)
15	W5
16	cDNA-Pool (Karyo, Rb, CHC,Dgn, Promo)
17	cDNA Rb1
18	SDS
19	Lam bda
20	Kalb
21	Cy3

Array 4: „Final“



1	Cy 5
2	Lamda
3	COT1
4	total
5	Kalb
6	W pool 1 (1,3,4,17,53)
7	W pool 2 (6,7,8,9,10,15,17,53)
8	W 1
9	W 3
10	W 4
11	W 5
12	W 6
13	W 7
14	W 8
15	W 9
16	W 10
17	W 15
18	W 17/19
19	W 22
20	W 46
21	W 53
22	W pool 3 (1,3,4,5,7,9,10,22,46,53)
23	Cy3/Cy5-Mix
24	W pool 4 (3,5,53, hohe Konzentrat.)
25	RB1
26	CHC1L
27	Karyo
28	DGN
29	t4
30	Promotor
31	Gene pool (Rb, Karyo, CHC, DGN, t4, Promo)
32	PAC 6
33	PAC 19
34	PAC 58
35	PAC 85
36	PAC 755
37	PAC ATM
38	ATM 4
39	ATM 8
40	ATM pool
41	YAC 1
42	YAC 2
43	YAC 3
44	YAC 4
45	cMYC
46	Lamin
48	bs PHE
49	bs TRP
50	bs DAP
51	BS LYS
52	SDS
53	Lamda
54	Cy3
55	GAP

Array 6: „Good-bye“



1	Cy3
2	COT
3	total human
4	cMYC 1
5	PAC 85
6	PAC 755
7	PAC ATM
8	cDNA ATM
9	YAC 2
10	YAC 3
11	YAC 4
12	Pool1 (1,3,4,5,6,7,9,Karyo)
13	Pool2 (1,3,4,5,6,7,9,10,15,17,22,46,53, Rb, Karyo)
14	Pool3 (1,3)
15	W5
16	cDNA-Pool (Karyo, Rb, CHC,Dgn, Promo)
17	Rb1
18	SDS
19	Lambda
20	Kalb
21	Cy3
22	W1
23	W53
24	W22
25	YAC 1
26	YAC 2
27	YAC 3
28	cMYC 2
29	cMYC 2 (hohe Konz.)

3.5. Objektträgerspezifische Unterschiede

Ein Parameter, der die Morphologie der Spots und die Haftungseigenschaften der DNA beeinflusst, ist die Oberfläche der Objektträger.

Für die Herstellung der DNA-Chips wurden mit NaOH-behandelte unbeschichtete Objektträger, sowie Aminosilan-beschichtete *Superfrost+*-Objektträgern (Menzel, Braunschweig) benutzt. Im Verlauf der Studie standen dann erstmals GAPS-Objektträger der Firma Corning (Corning, USA) zur Verfügung.

Zwischen den *Superfrost+*- und GAPS-Objektträger wurden Unterschiede direkt nach dem Spotten sichtbar (Abbildung 14): Obwohl es sich jeweils um Aminosilan-beschichtete Oberflächen handelte, erschienen die *Spots* auf GAPS-Trägern kleiner und homogener. Auch DNA-Zielstellen schwacher Intensität waren hier noch identifizierbar.

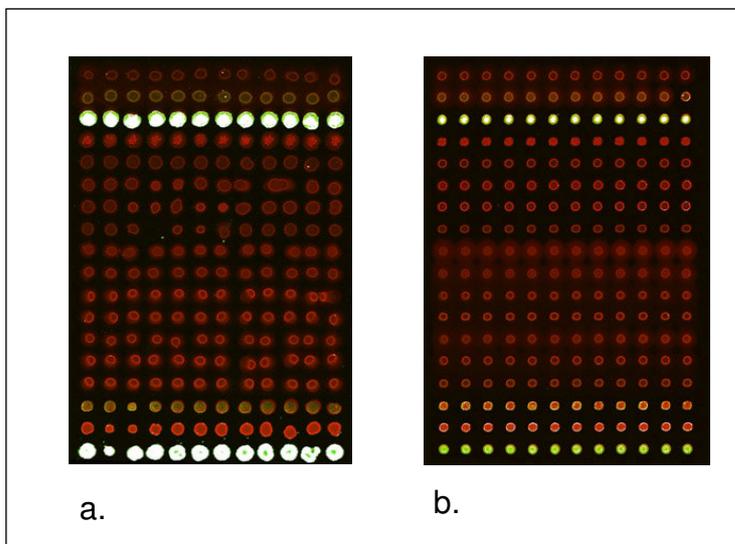


Abb. 14: Vergleich der Spot-Morphologie auf zwei kommerziell erhältlichen Aminosilan-beschichteten Objektträgern in unhybridisiertem Zustand
a. *Superfrost+*-Objektträger
b. Corning GAPS-Objektträger

Sämtliche der benutzten Objektträger lieferten brauchbare Ergebnisse bezüglich einer guten Haftung der Ziel-DNA und eines geringen Eigenhintergrundsignals. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden meist *Superfrost+*-Träger verwendet.

3.6. Untersuchungen zur Signalintensität bei Hybridisierungen auf Microarrays

Wie bereits erwähnt, stellt die Fluoreszenzintensität die zentrale Datenquelle der Microarray-Experimente dar. Da vergleichende Hybridisierungen zwischen zwei markierten Proben stattfinden, sind zwar die Absolutwerte der Intensität nicht entscheidend über das Ergebnis der Untersuchung eines Genoms, zu geringe Werte haben hier jedoch eine verminderte Aussagekraft. Sie sind 1) nicht sicher vom Hintergrund differenzierbar und 2) von Schwankungen, wie lokalen Verunreinigungen, stärker beeinflusst.

Da die bei ersten Hybridisierungsversuchen auf cDNA-Chips erzielten Intensitätswerte sehr gering ausfielen, wurde ein Schwerpunkt der Arbeit auf die Untersuchung dieses Parameters gelegt.

Sofern nicht anders vermerkt, handelt es sich bei den genannten Absolutwerten um die Mittelwerte sämtlicher *Spots* eines Klons (bzw. allgemein eines Hybridisierungs-Ziels). Diese Werte sind wiederum Mittelwerte der Pixelintensitäten, von denen der lokale Hintergrund abgezogen wurde. Der lokale Hintergrund wird vom Programm *GenePix* als der Mittelwert im Bereich des dreifachen Spotdurchmessers abzüglich des Spotbereiches für jeden der beiden Kanäle vermessen (Abbildung 15).

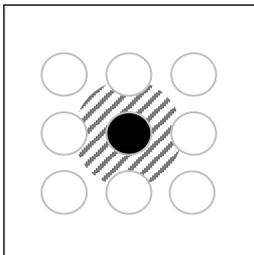


Abb. 15: Schematische Darstellung des Bereiches einer Spot-Matrix, der vom Programm *GenePix* als lokaler Hintergrund der einzelnen Spots ermittelt wird.

Schwarz: Betrachteter Spot in der Matrix,

Grau schraffiert: Bereich des dazugehörigen lokalen Hintergrundes

3.6.1. Methoden zur Markierung der Proben-DNA

Essentiell für eine hohe Signalstärke der gebundenen Probe auf dem Microarray ist der effiziente Einbau von markierten Nukleotiden. Die Intensität ist – zumindest in einem großen Bereich – linear abhängig von der Anzahl der Fluorochrome. Es wurden im Verlauf der Arbeit drei Varianten der Nick Translation-Markierungsreaktion getestet:

1. Standard-Nicktranslation

Nach dem in den Methoden beschriebenen Protokoll wurde ein Verdau der genomischen DNA durch das Enzym *Dnase I* durchgeführt. Zugleich fand eine Einbau-Reaktion mit Fluorochrom-markierten Nukleotiden in die entstandenen Einzelstrangbrüche durch *Polymerase I* statt.

2. Nicktranslation mit Kit

Das Protokoll entsprach dem der Standard-Methode, es wurden jedoch Komponenten des Labeling-Kits von ROCHE verwendet.

3. Markierung durch Verdau und Elongation mit Zufalls-Primern

In diesem Protokoll wurde der Verdau der DNA und der Einbau markierter Nukleotide im Gegensatz zu den ersten beiden Varianten nacheinander durchgeführt. Es wurde das Restriktionsenzym *Hae III* zum Verdau benutzt. Nach Denaturierung der genomischen DNA-Bruchstücke wurde die Elongation durch den Einsatz von Hexanukleotid-Primern und dem Klenow-Fragment der Polymerase I erreicht. Bei dieser Reaktion wurden markierte Nukleotide in die DNA eingebaut (Protokoll nach Pollack et al 1999).

Repräsentative Vergleichswerte der Methoden sind in Tabelle 10 dargestellt. Methoden 1 und 2 wurde im direkten Vergleich auf einem „Array 3“-Chip getestet, die Daten der Methode 3 stammen von einen „Array 6“-Chip. Dargestellt sind Mittelwerte sämtlicher DNA-Ziel der Chips.

Tabelle 10: Fluoreszenz-Intensitäten nach Markierung durch Standard-Methode, bzw. ROCHE-Kit, sowie durch Zufalls-Primer-Elongation. Es handelt sich um Durchschnittswerte der beiden Kanäle von sämtlichen DNA-Zielen der Chips. Die ersten beiden Methoden wurden in einem direkten Parallelexperiment, die dritte auf einer anderen Art von Array ermittelt.

	Mittlere Intensität bei 532 nm	Mittlere Intensität bei 635 nm
Standard Nick Translation	475 ± 223,2	259 ± 109,7
Nick Translation mit ROCHE-Kit	559 ± 225,3	131 ± 55,4
Zufalls-Primer-Methode	605 ± 447,8	240 ± 186,7

Wie aus den Werten ersichtlich, konnte durch die Anwendung von Komponenten des Markierungs-Kits keine Steigerung der Signalintensität erreicht werden. Tendenziell lieferte die dritte Methode leicht verbesserte Intensitäten, sie wurde für weitere Markierungen angewendet.

3.6.2. Konzentration der Proben-DNA

Der Erhöhung der Konzentration der Ziel-DNA auf den Microarrays steht eine Steigerung der Konzentration der eingesetzten Proben-DNA gegenüber. Sofern nicht bereits eine Sättigung erreicht wurde, sollte durch die Zugabe einer größeren Menge markierter DNA die resultierende Signalintensität erhöht werden können.

Als Standard wurde bisher zumeist eine DNA-Konzentration von 0,5 µg/µl pro Probe für die Hybridisierung auf einen Chip eingesetzt (S.Lampel, pers. Mitteilung).

In zwei parallelen Hybridisierungs-Versuchen wurde eine Konzentration von 0,5 und 1,0 µg/µl Proben-DNA eingesetzt und die Intensitäten verglichen.

Es konnte mit der verdoppelten Konzentration eine durchschnittlich zwei- bzw. dreieinhalbfache Verstärkung der Signale für 532, bzw. 635 nm erzielt werden.

3.6.3. Konzentration der Ziel-DNA

Es wurden in unterschiedlichen Experiment-Reihen Microarrays hergestellt, die identische Ziel-DNA in verschiedenen Konzentrationen trugen. Nach Hybridisierung unter vergleichbaren Bedingungen wurden die resultierenden Intensitäten verglichen.

Die Ziel-DNA lag dabei in Konzentrationen von 125, 250, 500 ng/µl in einer ersten Experimentserie, bzw. 1000, 2000 und 4000 ng/µl in einer zweiten Serie vor. In den Diagrammen 3 bis 6 sind die Intensitätswerte der unterschiedlichen Konzentrationen getrennt nach den beiden Fluoreszenz-Kanälen aufgetragen. Die Bezeichnungen der Datenserien stehen für vergleichbare Wiederholungsexperimente, d.h. unterschiedliche Hybridisierungen auf Arrays der gleichen Art.

Diagramme 3 und 4: Absolute Intensitäten gegen die Konzentrationen der Ziel-DNA

Gezeigt sind die logarithmierten Intensitäts-Werte (Cy3: 532 nm, bzw. Cy5: 635 nm) von drei unterschiedlichen Ziel-DNA-Konzentrationsreihen (125, 250 und 500 ng/μl) mit je zwölf Replikaten (DNA-Ziel-Bezeichnungen entsprechend der Tab. 9, Abschn. 3.4.) aus drei Hybridisierungs-Experimenten (A, B und C). Die beiden mit * markierten Datenpunkte wurden als „Ausreisser“ im Vergleich zu der gezeigten Tendenz betrachtet und bei weiteren Berechnungen nicht gewertet.

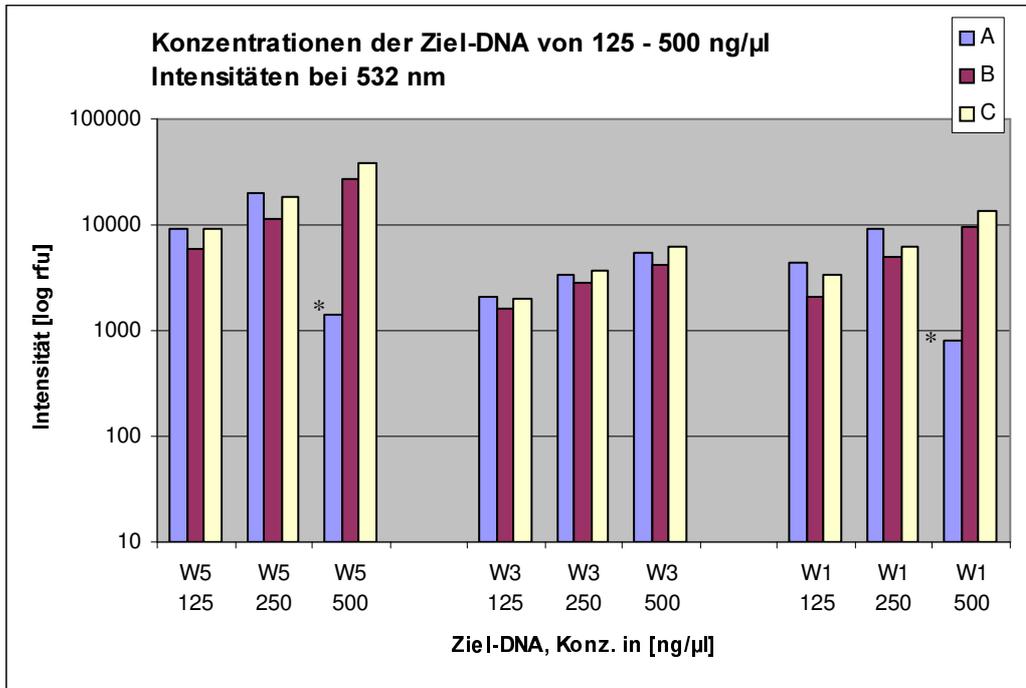


Diagramm 3

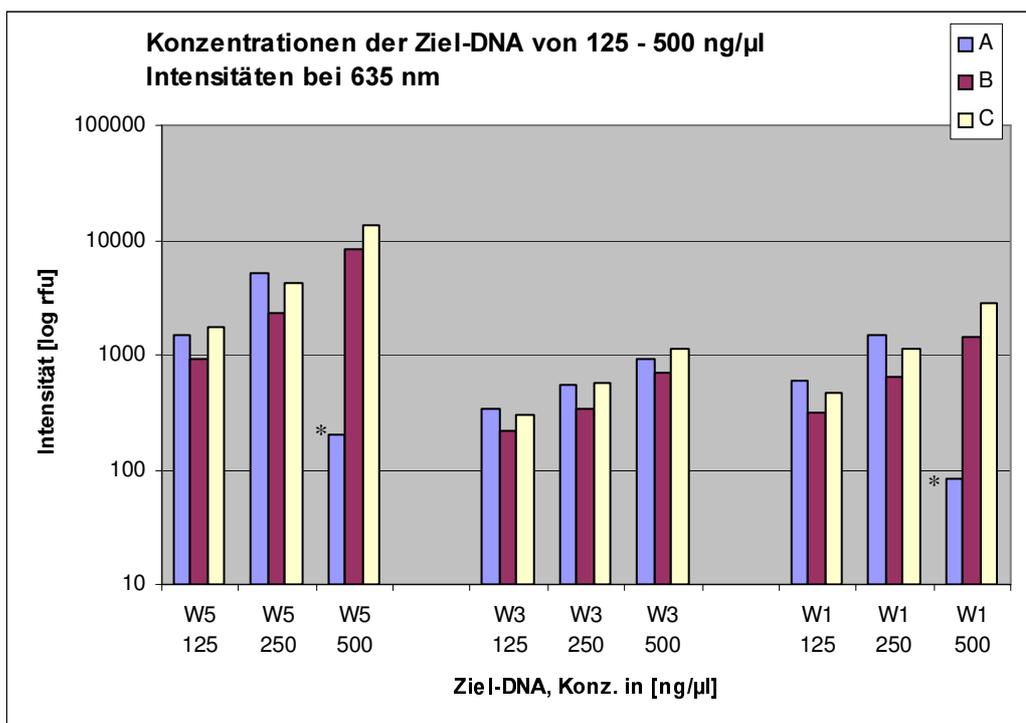


Diagramm 4

Diagramme 5 und 5: Absolute Intensitäten gegen die Konzentrationen der Ziel-DNA

Gezeigt sind logarithmierte Intensitäts-Werte (Cy3: 532 nm, bzw. Cy5: 635 nm) von zwei unterschiedlichen Ziel-DNA-Konzentrationsreihen (1000, 2000 und 4000 ng/μl) mit je zehn Replikaten aus zwei Experimenten (A und B). (Bezeichnungen entsprechend der Tab. 9, Abschn. 3.4.)

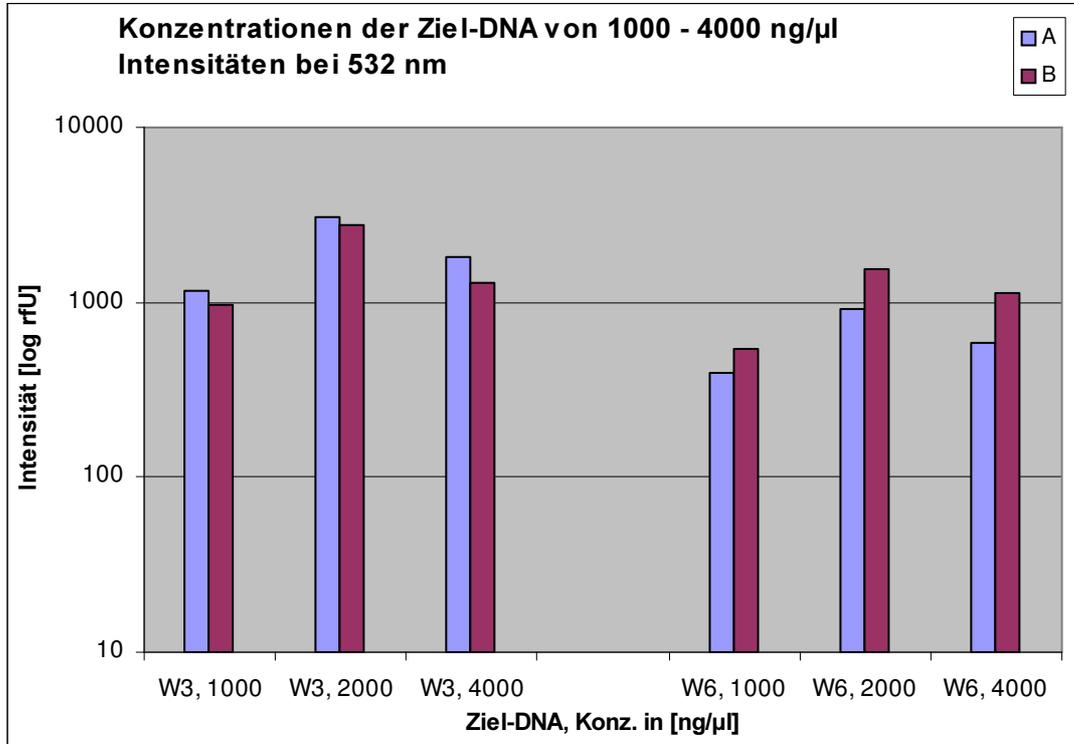


Diagramm 5

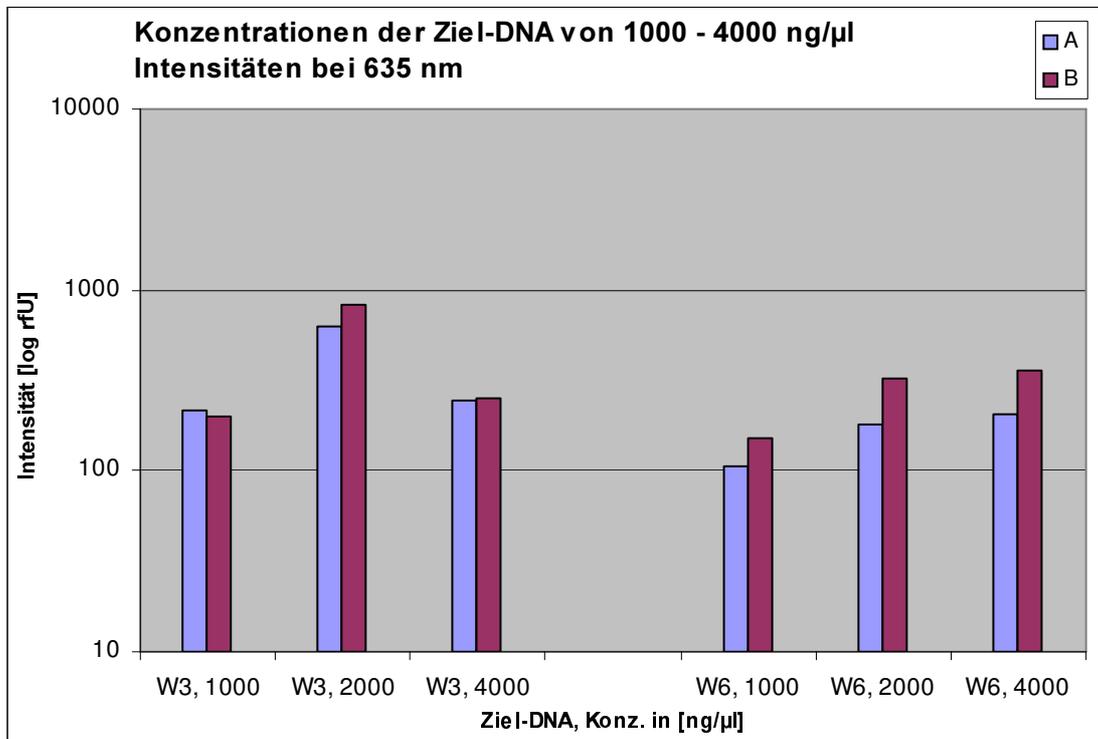
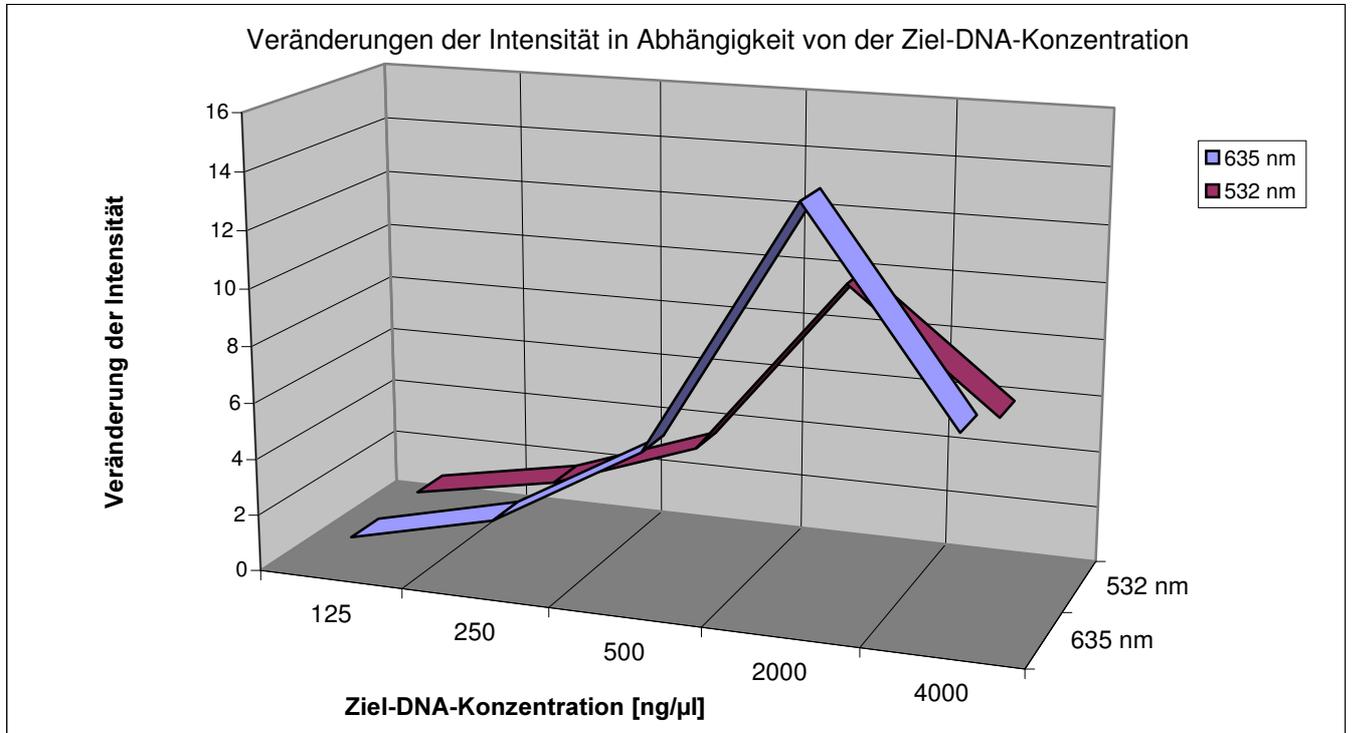


Diagramm 6

Die Veränderungen der Intensität in Abhängigkeit von der Konzentration der Ziel-DNA sind zusammenfassend in Diagramm 7 und Tabelle 11 dargestellt.

Diagramm 7: Vervielfachung der Intensitäts-Werte im Verhältnis zum Wert der Konzentration von 125 ng/µl.



Tab 11: Veränderungen der Intensität bei einer Verdopplung der Ziel-DNA-Konzentration. Die Werte von 125, bzw. 1000 ng/µg waren die Ausgangskonzentrationen der beiden Messreihen.

Wellenlänge	DNA-Konzentration auf dem Microarray					
	125	250	500	1000	2000	4000
532 nm	1	1,9 ± 0,19	1,9 ± 0,32	1	2,7 ± 0,11	1,7 ± 0,33
635 nm	1	2,2 ± 0,47	2,3 ± 0,41	1	2,7 ± 1,11	2,0 ± 1,27

Es zeigte sich eine direkte Abhängigkeit der Intensität von der vorliegenden Konzentration. Bei Verdopplung der Konzentration erhöhte sich auch die Intensität im Durchschnitt um den Faktor zwei.

Bei einer Konzentration von 4 µg/µl kam es wiederum zu einer Verringerung der gemessenen Intensität. Für nachfolgende Experimente dieser Studie wurden möglichst Konzentrationen der Ziel-DNA-Lösungen von 2 µg/ml auf die Microarrays aufgebracht.

3.6.4. Komplexität der Ziel-DNA

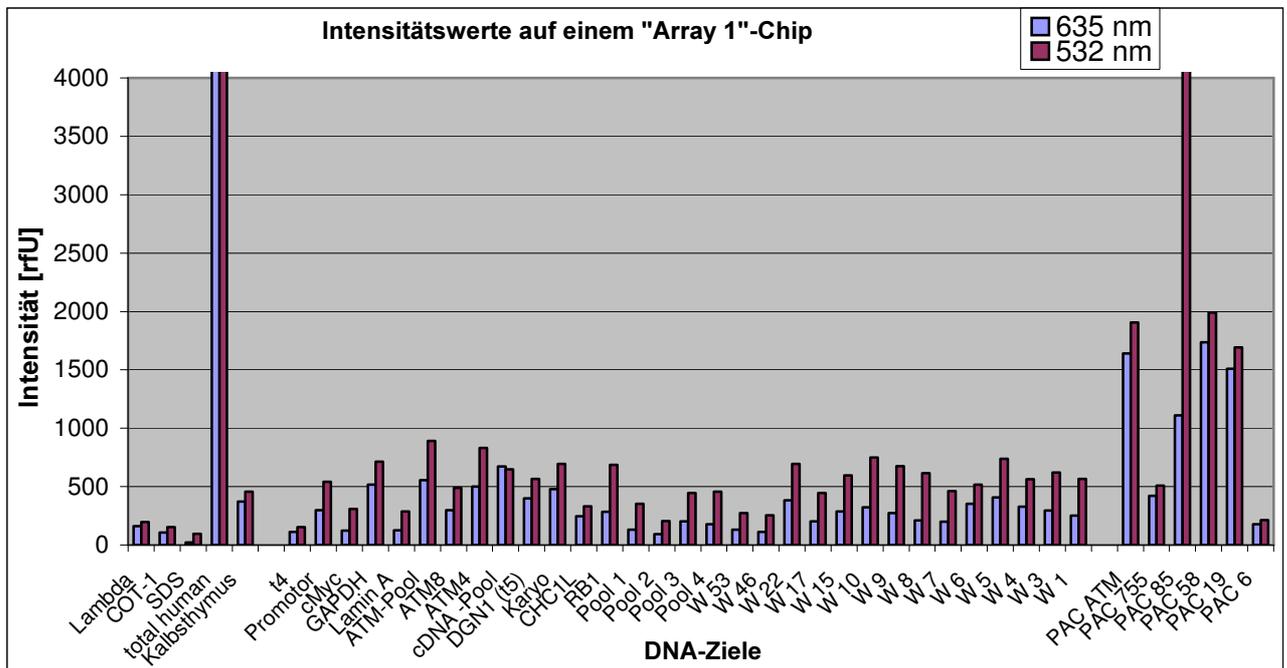
Nachdem bereits erfolgreich Studien mit YAC- und PAC-DNA-Microarrays angefertigt wurden (Solinas-Toldo et al 1997, M. Neßling, bzw. S. Lampel, pers. Mitteilungen), wurden in dieser Arbeit Hybridisierungs-Experimente mit cDNA-Zielen im Vergleich zu PAC- und YAC-Fragmenten als Zielmoleküle durchgeführt. Zu testen war hierbei der Einfluß der ungleich kürzeren Ziel-Sequenz der cDNAs: Gegenüber ca. 1000 kbp-langen YAC-Insertionen, die nach einer ALU-PCR-Amplifikation (vgl. Abschnitt 2.2.2.1.6.) als Pool von Sequenzen verschiedener Größe vorlagen, und ca. 100 kbp-langen Fragmenten aus PACs, betrug die Länge der eingesetzten cDNA-Abschnitte nur 1-2 kbp.

Um die Gesamtkomplexität der cDNA-Ziele zu erhöhen, wurden auch Pools von kombinierten cDNA-Fractionen auf die Arrays aufgebracht und die Hybridisierungsergebnisse verglichen. Von der Komplexität sollten diese cDNA-Ziele damit den YAC-Zielen ähnlicher werden.

Eine direkte Vergleichsmöglichkeit der Hybridisierungseffizienz auf PACs bzw. cDNAs ergab sich z.B. aus den Signalintensitäten der *c-MYC*-Ziel-cDNA und dem PAC 85, welcher *c-MYC*-Sequenzen aus dem genomischen Bereich 8q24 enthielt. Analog war ein Vergleich des *ATM*-Gens möglich, welches als cDNA mit 3'- bzw. 5'-Ende (DNA-Moleküle mit den Bezeichnungen *ATM4*, bzw. *ATM8*) sowie als genomische Sequenz in einem PAC vorlag.

Diagramm 8 zeigt als Beispiel Intensitätswerte einer Hybridisierung von COLO-320- (Cy5-markiert) und Referenz-DNA (Cy3-markiert) auf einen „Array1“-Chip. In Tabelle 12 sind zu diesem Experiment die gemittelte Intensitätswerte der beiden Ziel-Gruppen angegeben.

Diagramm 8: Intensitätswerte unterschiedlicher Ziel-DNAs (PACs und cDNAs), reduziert um den lokalen Hintergrund. Serie 1 auf einem „Array 1“-Chip. Die Bezeichnungen der DNA-Ziele sind in Tab. 9, Abschnitt 3.4. erläutert. Die Pool-Zusammensetzungen sind untenstehend erläutert.



Pool-Zusammensetzungen „Array 1“:

Pool 1:	W 1, 3, 22	(3,6 kb insgesamt)
Pool 2:	W 5, 15, 17	(6,8 kb insgesamt)
Pool 3:	W 10, 46, 53	(4,4 kb insgesamt)
Pool 4:	W 4, 7, 9	(3,2 kb insgesamt)

Tab. 12: Vergleich der gemittelten Intensitäten der Daten des Diagramms 9 („Array 1“-Chip) nach Ziel-DNA-Gruppen

Ziel-DNA-Gruppe	Durchschnittsintensität bei 532 nm [rfU]	Durchschnittsintensität bei 635 nm [rfU]
cDNAs	523	285
PACs	3015	1283

Hier ist deutlich erkennbar, daß die Signalintensität der PAC-Ziele im Durchschnitt fünfmal erhöht gegenüber dem Durchschnitt der cDNA-Ziele war. PAC 85 mit genomischen *cMYC*-Sequenzen lieferte mit einem Wert von 8981 rfU im Cy3-Kanal die höchste Intensität überhaupt, während die vergleichbare *cMYC*-cDNA eine kaum auswertbar geringe Intensität zeigte (307 rfU im Cy3-Kanal). Ein ähnliches Verhältnis zeigen die beiden unterschiedlichen Ziele des *ATM*-Gens.

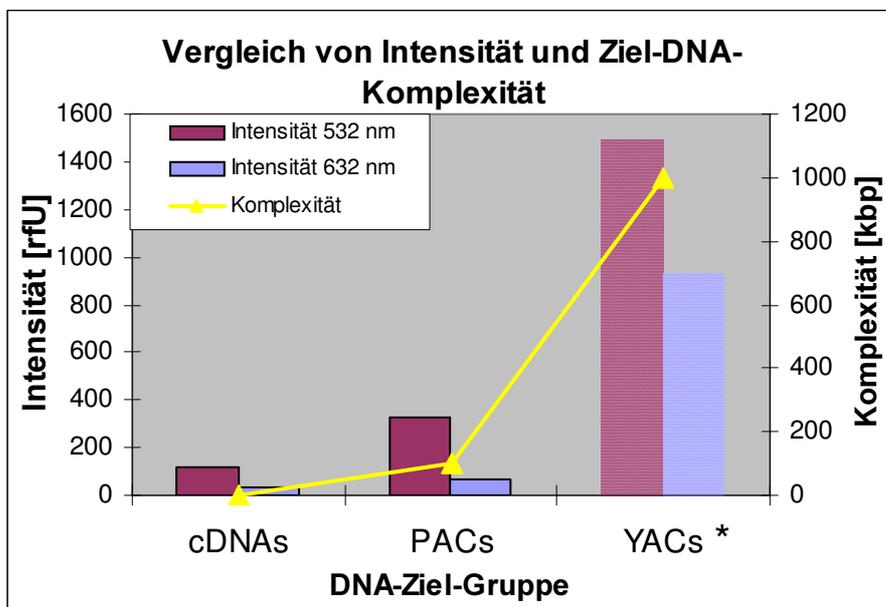
In einer zweiten Datenserie (Tabelle 13) wurden die Intensitäten auf einem „Array 4“-Chip, auf denen zusätzlich YAC-Ziele vorhanden waren, verglichen. Die Ziel-DNAs waren hier, wie auch in Serie 1, in Wasser gelöst aufgetragen.

Tab. 13: Vergleich der gemittelten Intensitäten der zweiten Serie auf einem „Array 4“-Chip

Ziel-DNA	Durchschnittsintensität bei 532 nm [rfU]	Durchschnittsintensität bei 635 nm [rfU]
cDNAs	114	37
PACs	325	70
YACs	1493	931

Die Fluoreszenz-Intensitäten waren hier insgesamt deutlich geringer, die Unterschiede zwischen den Gruppen der Ziel-Nukleinsäuren wurden jedoch, wie in Diagramm 9 gezeigt, besonders deutlich.

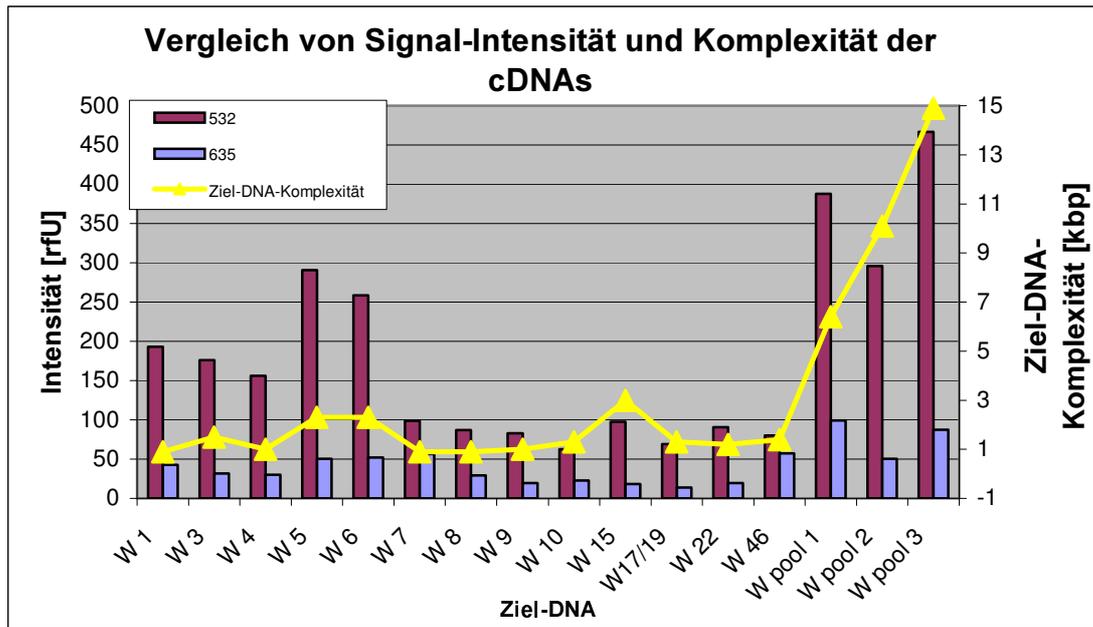
Diagramm 9: Direkter Vergleich der Intensitäten der durchschnittlichen Cy3- und Cy5-Signale von unterschiedlicher Ziel-DNA-Gruppen zu deren Komplexität („Array 4“-Chip)



* Als Komplexität der YAC-Ziele ist die Gesamtgröße des klonierten Fragments angegeben. Das Hybridisierungsziel ist jedoch aufgrund der Amplifizierung mittels ALU-PCR eine Ansammlung unterschiedlich komplexer Fragmente

Auch innerhalb der Gruppe von cDNAs aus dem chromosomalen Bereich 13q14 war die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität von der Größe des Fragments erkennbar (Diagramm 10).

Diagramm 10: Vergleich der Intensitäten der cDNA-Ziele zu deren Komplexität auf einem „Array 4“-Chip
 Beschreibung der DNA-Ziele: Tab. 9, Abschn. 3.4.; Poole: s.u.



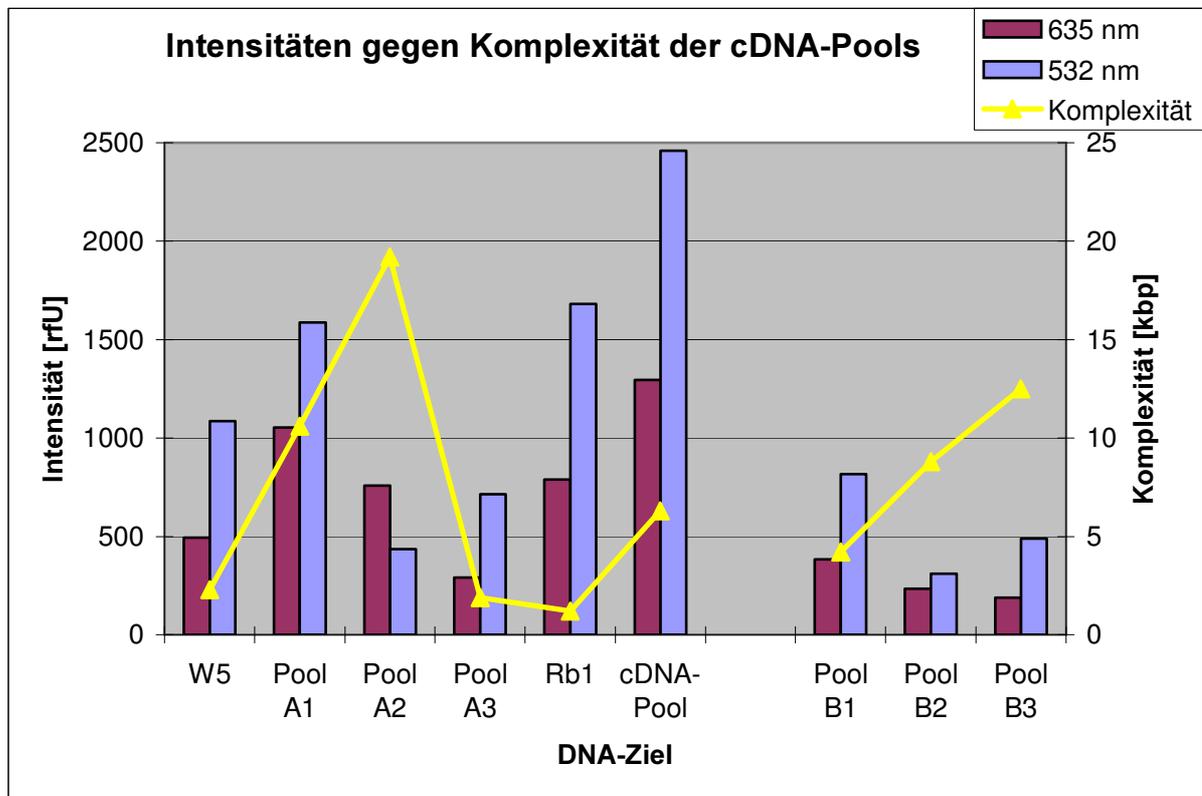
Zusammensetzung der	Pool 1:	W 1, 3, 4, 17, 53	6,4 kbp
cDNA-Poole:	Pool 2:	W 6, 7, 8, 9, 10, 15, 17, 53	10,1 kbp
	Pool 3:	W 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 22, 46, 53	14,9 kbp

Trotz der vergleichsweise sehr geringen Unterschiede in der Sequenzlänge, wurde eine direkte Korrelation zwischen der gemessener Fluoreszenz-Intensität und der Komplexität des Hybridisierungs-Ziels deutlich, wenngleich die absoluten Fluoreszenz-Intensitäten nach Abzug der lokaler Hintergrund-Werte hier sehr gering war. Eine Steigerung der Intensität war bei den cDNA-Kombinationen (Pool 1-3) zu sehen.

Um die Intensitätsentwicklung bei der Komplexitätssteigerung durch cDNA-Pools näher zu untersuchen wurden weitere Hybridisierungen mit dieser Art von Molekülen durchgeführt (Diagramm 11).

Diagramm 11: Intensitäten unterschiedlicher cDNA-Ziele im Vergleich zu deren Komplexität (Ergebnisse von einem „Array 5“- und einem „Array 3“-Chip)

Beschreibung der DNA-Ziele und -Pole: s.u.



„Array 5“-Chip		Komplexität [kbp]
W 5	Variante von <i>BCMS</i>	2,3
Pool A1	W 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 und Karyoferrin	10,6
Pool A2	W 10, 15, 17, 22, 46, 53 und Rb	19,2
Pool A3	W 1, 3	1,9
RB1	<i>Retinoblastoma1</i> -cDNA	1,2
cDNA-Pool	RB1, Karyo, CHC, DGN	6,3
„Array 3“-Chip		
Pool B1	W 1, 3 und 5	4,2
Pool B2	W 6, 7, 8, 9, 15, 53	8,8
Pool B3	W 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 22, 46, 53	12,5

Die Hybridisierungen lieferten kein einheitliches Bild zur vorausgegangenen Überlegung der Kombination mehrerer cDNA-Ziele. Allgemein gab es eine Steigerung der Intensität. Die kombinierte Menge der im Pool enthaltenen unterschiedlichen Sequenzen (kombinierte Komplexität) hatte jedoch keinen direkten Einfluß auf die Intensität.

3.7. Vergleich der Hybridisierungs-Ratios

Um Aussagen über Imbalancen im zu testenden Genom zu machen, müssen mittels der Quotienten aus Test- und Referenz-Signalen Verhältniswerte (*Ratios*) gebildet werden. Ein Ratio mit einem Wert von eins entspricht einem balancierten Zustand der analysierten chromosomalen Region, Werte größer eins zeigen einen Zugewinn, Werte kleiner eins einen Verlust von genetischem Material im Test-Genom auf.

In verschiedenen Experimentreihen wurden Ko-Hybridisierungen genomischer DNA der Tumorzelllinie COLO-320 mit Referenz-DNA (Plazenta-DNA, Sigma, Heidelberg) auf unterschiedlichen Microarrays durchgeführt. Die erzielten Fluoreszenzintensitäten wurden in vorangegangenen Abschnitten vorgestellt, hier sollen daraus errechnete Ratios verglichen werden.

Das Diagramm 15 zeigt die Ergebnisse einer Hybridisierung auf einen „Array 1“-Chip, bei der die Tumor-DNA in Cy5, die Referenz-DNA in Cy3 markiert wurde. Es handelt sich um Verhältniswerte der um den lokalen Hintergrund reduzierten Signale. Sie wurden mittels Division durch einen Kontrollwert normalisiert. Die Gruppe der Kontrollen bestand in diesem Fall aus folgender Zielstellen:

cDNA-Ziele: *GAPDH*, *ATM4*, *ATM8*, *ATM*-Pool

PAC-Ziele: PAC ATM, PAC 755 und PAC 19

Die humanen Sequenzen dieser Bereiche liegen im Tumor- und Referenzgenom in einem ausgeglichenen Verhältnis vor, wie durch das Ergebnis der chromosomalen CGH (Abschnitt 3.2.) bestätigt wurde. Die Ratios der genannten Kontroll-Ziele wurden gemittelt, der errechnete Mittelwert lag bei $1,5 \pm 0,59$. Über die Angabe der Standardabweichung kann

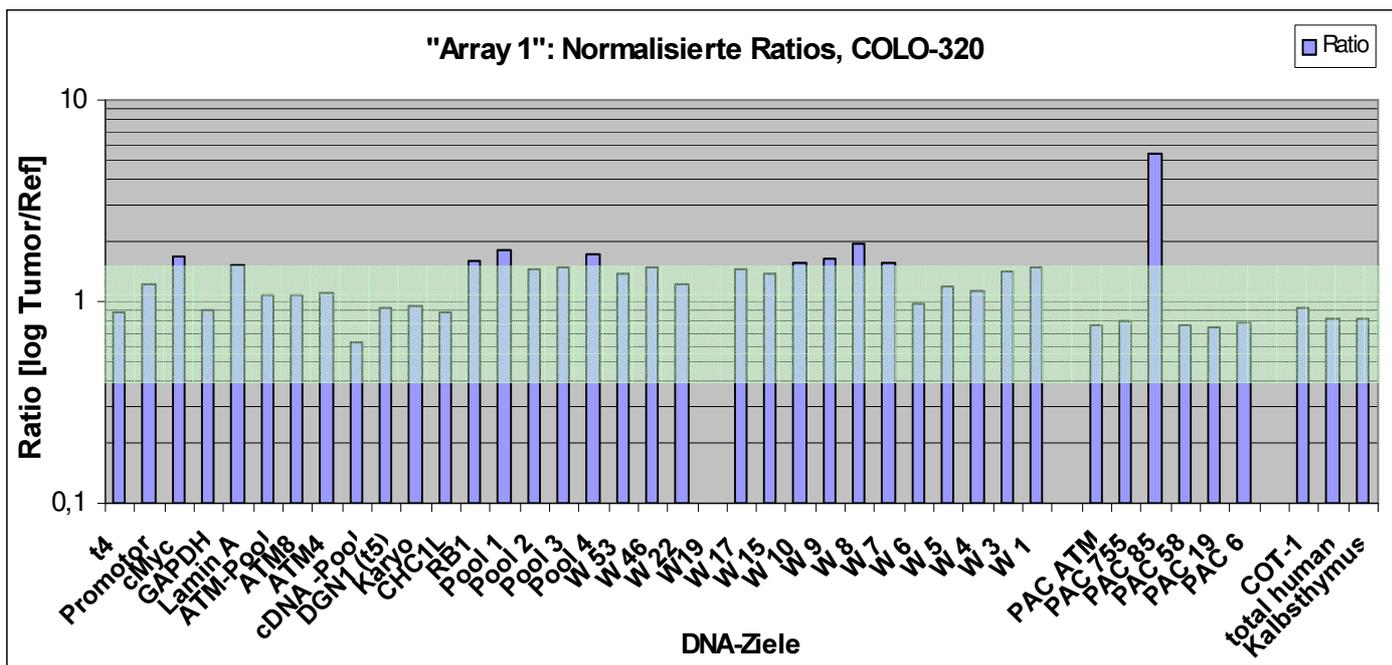
ein Bereich bestimmt werden, innerhalb dessen Klone als balanciert angenommen werden. Dies bedeutet auch, daß mit einer inhomogenen Kontrollgruppe Imbalancen schwerer zu detektieren sind. Im Diagramm ist der Bereich durch eine grüne Unterlegung angedeutet.

Die Normalisierung der Ratio-Werte ist wichtig, um einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Hybridisierungen zu ermöglichen. Das Ergebnis der Analyse der genomischen Imbalancen wird dadurch unabhängig von den jeweiligen experimentellen Parametern

Im Diagramm 15 zeigt das Ratio der PAC85-Zielstelle die starke Amplifikation des *cMYC*-Lokus in der COLO-320-Zelllinie auf (Ratio:5,4), die auch durch das Ergebnis der

chromosomalen CGH gezeigt wurde. Mit der cDNA des *cMYC*-Gens als *Target* war zumindest eine schwache Überrepräsentation detektierbar (Ratio: 1,7). Die detektierten Imbalancen sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Diagramm 15: Logarithmierte Ratios der Hybridisierung von COLO-320- gegen Referenz-DNA auf einen „Array 1“-Chip. Die Normalisierung der Werte erfolgte mittels des Mittelwertes der Kontroll-Klone GAPDH, ATM4, ATM8, ATM-Pool, PAC 19, PAC ATM und PAC 755. Die zweifache Standardabweichung des Kontrollgruppen-Mittelwertes, in dem sich als balanciert geltende Klone befinden ist mit einem grünen Bereich angezeigt. Die Bezeichnungen der DNA-Ziele sind in Tab. 9 in Abschnitt 3.4. erläutert. Pool-Zusammensetzungen: s.u.



Pool-Zusammensetzungen „Array 1“:

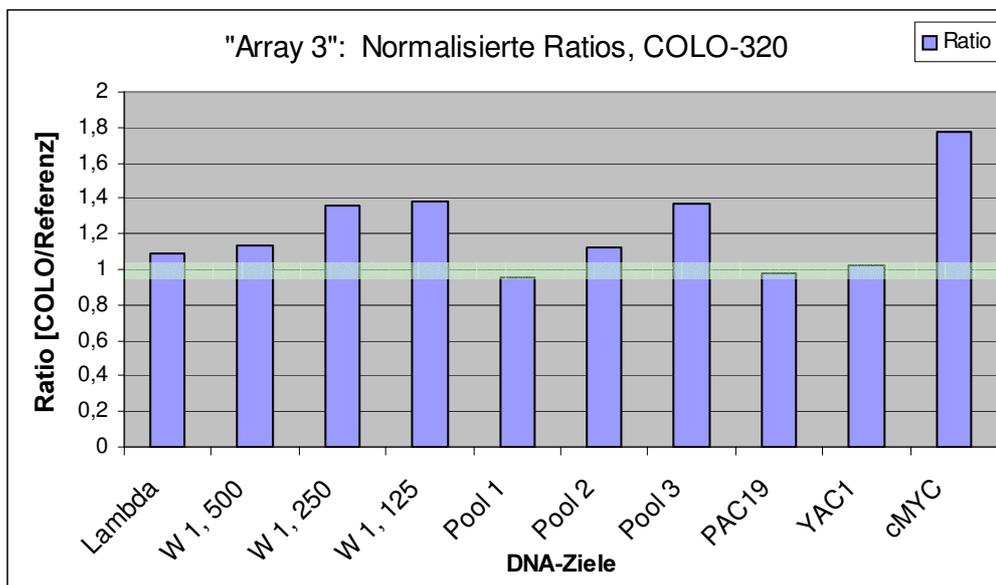
Pool 1:	W 1, 3, 22	(3,6 kb insgesamt)
Pool 2:	W 5, 15, 17	(6,8 kb insgesamt)
Pool 3:	W 10, 46, 53	(4,4 kb insgesamt)
Pool 4:	W 4, 7, 9	(3,2 kb insgesamt)

Tab. 15: Die mit mCGH auf einem „Array 1“-Chip detektierten Imbalancen der Zelllinie COLO-320, sortiert nach normalisierten Ratio-Werten

Ziel-Stelle	Informationen	Ratio-Werte
PAC 85	genomische <i>c-MYC</i> -Sequenz	5,4
W 8	Variante von <i>BCMS</i> (0,9 kbp)	1,9
Pool 1	Kombination von W 4 / 7 / 9 (3,6 kbp)	1,8
Pool 4	Kombination von W 1 / 3 / 22 (3,2 kbp)	1,7
cMYC	<i>cMYC</i> -cDNA (0,7 kbp)	1,7
W 9	Variante von <i>BCMS</i> (1 kbp)	1,6
RB 1	<i>Retinoblastoma 1</i> -cDNA (1,2 kbp)	1,6

Das Diagramm 16 zeigt die normalisierten Ratios einer Hybridisierung von COLO-320- gegen Referenz-DNA auf einen „Array 3“-Chip. Aufgrund sehr geringer Intensitäten wurden die Fluoreszenz-Signale nicht um den Hintergrund reduziert. Der Kontrollwert wurde in diesem Fall aus den Ratios der Zielstellen von PAC 19 und YAC 1 gemittelt ($0,7 \pm 0,02$).

Diagramm 16: Normalisierte Ratios der Hybridisierung von COLO-320- gegen Referenz-DNA auf einen „Array 3“-Chip. Die Normalisierung erfolgte mittels der Kontroll-Klone PAC 19 und YAC1. Die DNA des Klons W 1 ist in Konzentrationen von 125 bis 500 ng/µl als Ziel vorhanden; Poolzusammensetzungen: s.u.



Poolzusammensetzungen „Array 3“:

Pool 1:	W1, 3, 5	(4,2 kbp)
Pool 2:	W 6, 7, 8, 9, 15, 53	(8,8 kbp)
Pool 3:	W 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 22, 46, 53	(12,5 kbp)

Tab. 16: Mit einem „Array 3“-Chip detektierte Imbalancen in COLO-320

Ziel-Stelle des Microarrays	Informationen	Ratio-Werte
c-MYC	cMYC-cDNA	1,8
W 1, 500	Variante von BCMS (0,9 kbp), 500 ng/µl	1,1
W 1, 250	W 1, 250 ng/µl	1,4
W 1, 125	W 1, 125 ng/µl	1,4
Pool 1	Kombination von W 1, 3, 5	1,0
Pool 2	Kombination von W 6, 7, 8, 9, 15, 53	1,1
Pool 3	Kombination von W 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 22, 46, 53	1,4

Auch die in Diagramm 16 dargestellten Ratios der Hybridisierung von COLO-320- gegen Referenz-DNA auf einen „Array 3“-Chip zeigen die Amplifikation des *c-MYC*-Lokus. In diesem Experiment ist sie mit einem Ratio von 1,8 jedoch weniger dominant. Ferner ist die Überrepräsentation des durch die Spleiss-Variante W 1 in unterschiedlichen Konzentrationen (125, 250 und 500 µg/µl), sowie durch drei verschiedene cDNA-Kombinationen (Pool 1-3) vertretene *BCMS*-Gens angedeutet. Die Ratio-Werte des Experiments sind in Tabelle 16 aufgelistet. Interessanterweise ist die Ausprägung des Ratios bei schwächeren Konzentrationen der Ziel-DNA stärker. Durch die Kombination einer größeren Anzahl unterschiedlicher Spleiss-Varianten dagegen erhöht sich das Ratio.

Die Werte der Ratios aus Diagramm 15 und 16 entsprechen den Verhältnissen der durch die chromosomale CGH charakterisierten Imbalancen insofern, daß eine *high copy number*-Amplifikation des *cMYC*-Lokus und eine Überrepräsentation des chromosomalen Bereiches 13q14 vorliegt. Erstere konnte sowohl mit PAC-Klonen als auch cDNA-Fragmenten, letztere durch *RB1*, einzelne Spleiss-Varianten von *BCMS* und Kombinationen der Varianten gezeigt werden.

3.8. Entwicklung eines Computerprogramms zur Auswertung von mCGH-Experimenten

Mit zunehmender Komplexität der Matrix von Ziel-DNA-Fragmenten werden spezialisierte Auswerteverfahren unverzichtbar. Ohne die elektronische Verarbeitung ist ein sinnvoller Umgang mit den biologischen Daten nicht mehr möglich. Erreicht werden muß dabei eine weitgehende Automatisierung, zugleich große Flexibilität und Zuverlässigkeit.

In der Sprache Visual Basic (Version 6.0, Microsoft) entstand unter der Leitung von G. Wrobel ein Programm, welches den Arbeitsnamen *C.A.M.A.* (Computer aided Microarray Analysis) trug. Es ist Plattform-unabhängig und kann jederzeit den Wünschen der Benutzer angepasst werden. Abbildung 16 zeigt die Arbeitsoberfläche des Programms. *C.A.M.A.* befand sich zum jetzigen Zeitpunkt noch in der Entwicklungsphase, erlaubte jedoch bereits eine Auswertung der Hybridisierungsergebnisse nach folgendem Schema:

1. **Einlesen** der vom Scanner produzierten (*.gpr-) Datei
 - mit automatischem Erkennen von Referenz-, Test- und nicht auszuwertenden Klonen, sofern entsprechende Identifizierungsnummern vergeben wurden
 - Ignorieren von zuvor markierten Einzelspots
2. **Hintergrund-Korrekturmöglichkeiten:**
 - Abzug eines globalen Wertes von allen Spots
 - Korrektur durch lokale Hintergrundwerte jedes Einzelspots
 - Kombination dieser Optionen
3. **Qualitätskontrolle:** Verbesserung der Standardabweichung von Klonwerten durch Ignorieren von Extremwerten einzelner Klone
4. Berechnung der Werte sämtlicher Referenz-Klone als **Kontrol-Kluster** und statistische Analyse der Homogenität mittels T-Test.
5. Beurteilung der **statistischen Sicherheit** sämtlicher Klone mittels T-Test und **Normalisierung** mit Hilfe des Kontrol-Kluster-Wertes.
6. **Farbliche Hervorhebung** von Feldern der Ergebnistabelle, die (wählbare) Qualitäts-Anforderungen (nicht) erreichen.
7. Einfache graphische Darstellung der errechneten Ratios in einem **Balkendiagramm**

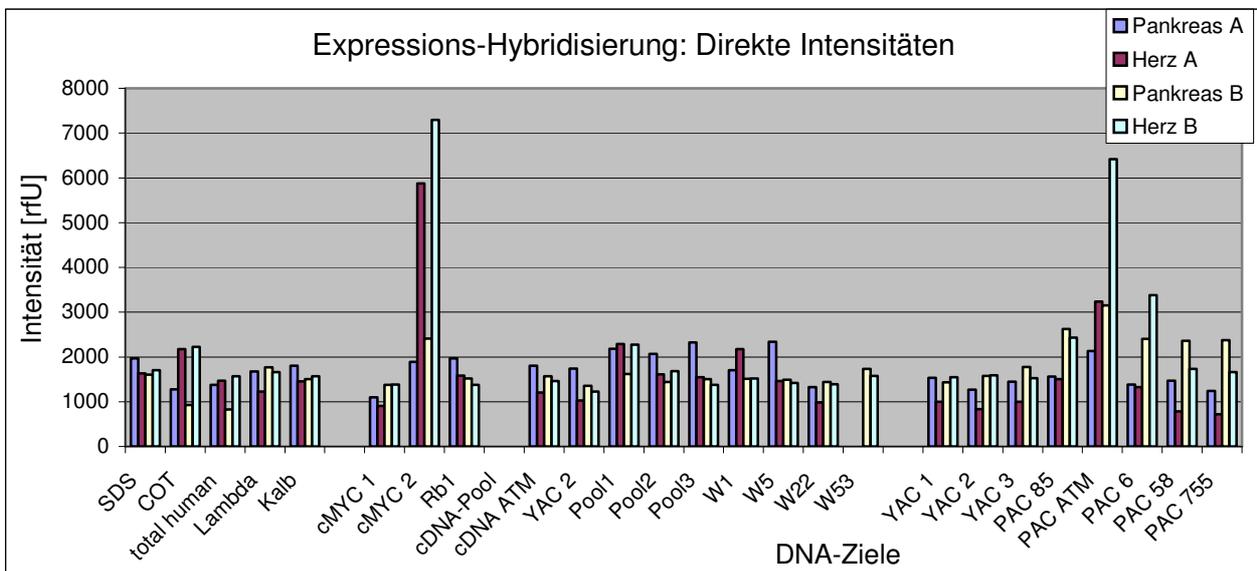
Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit selbst wurden zum Großteil noch mit Hilfe von Standardfunktionen des Programms Excel (Microsoft) erarbeitet, da *C.A.M.A.* noch nicht fertiggestellt war und bei den meistens Punkten lediglich auf vergleichende Betrachtungen der Intensitätswerte Wert gelegt wurde.

3.9. Expressions-Hybridisierung

cDNA-Fragmente eignen sich unter anderem deshalb schlechter als Ziele einer genomischen Hybridisierung, weil ihnen die großen nicht-kodierenden Sequenzen fehlen. Anders herum betrachtet hybridisieren genomische Proben, wie die in dieser Studie benutzte COLO-320-DNA, unter anderem deshalb schlechter auf cDNA-Ziele, weil sie durch Intron-bereiche unterbrochen sind und somit eine andere Struktur als die exprimierten Sequenzen aufweisen. Beim Einsatz von cDNA als Probe sollte diese Problematik wegfallen. Zur Beurteilung dieser These wurden Expressions-Hybridisierungen auf die Microarrays durchgeführt. Die Analysen wurden mit Ribonukleinsäuren aus humanem Herz-, bzw. Pankreasgewebe als Ausgangsmaterial durchgeführt, welche in cDNA umgeschrieben und dabei fluoreszenzmarkiert wurden. Herz- und Pankreas-Expression sollte analysiert werden, da hier durch vorangegangene Northern-Blot-Untersuchungen eine differenzielle Aktivität bzgl. der verschiedenen Spleiss-Varianten der chromosomalen Region 13q14 gezeigt worden war (D. Mertens, pers. Mitteilungen). Dabei war eine im Vergleich erhöhte Expression von der dem Klon *W 53* entsprechendem Variante in den untersuchten Pankreaszellen beobachtet worden. In Herzzellen kam es zu einer Überexpression von Varianten, die das Exon *Leu1* enthielten (*W 1 – W 19*). Das Diagramm 17 zeigt die gemessenen Intensitäten von zwei Hybridisierungsversuchen. Die aus Herzgewebe stammende mRNA wurde mit Cy3-, die mRNA aus dem Pankreas mit Cy5-Markierungen umgeschrieben.

Diagramm 17: Intensitätswerte der Expressions-Hybridisierung auf einem „Array6“-Chip

Die Bezeichnungen der DNA-Ziele sind in Tabelle 9 in Abschnitt 3.4. erläutert. Bei *cMYC2* handelte es sich um *cMYC*-cDNA in erhöhter Konzentration (ca. 3 µg/µl) gegenüber *cMYC1* (ca. 1 µg/µl). Gezeigt sind direkt gemessene Intensitäten der beiden Kanäle ohne Hintergrund-Korrektur von zwei Hybridisierungen (A und B).

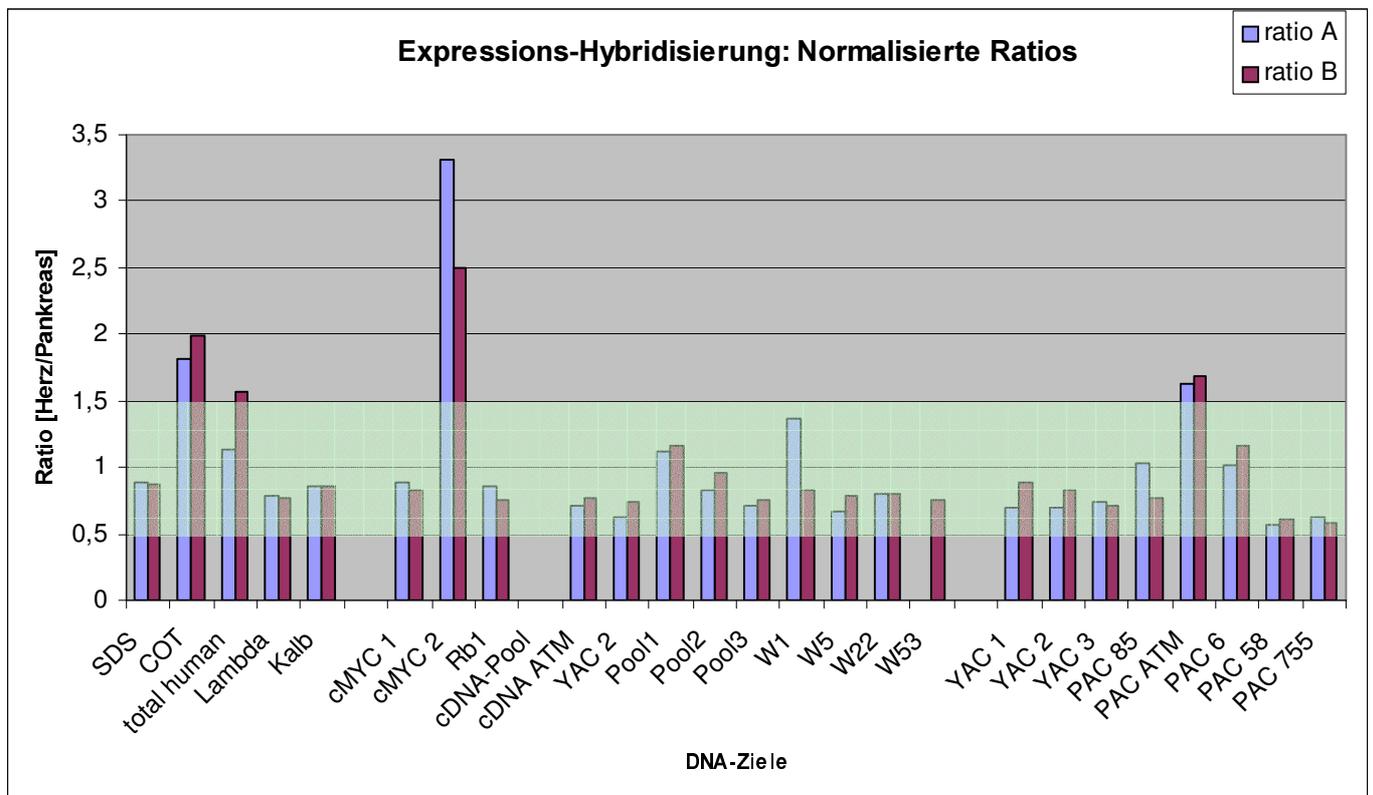


Der Objektträger wies nach der Hybridisierung einen relativ hohen Hintergrund auf, nach Abzug des lokalen Hintergrunds kam es zu negativen Intensitätswerten. Dies ist im Vergleich zu genomischen Hybridisierungen beim *Expression Profiling* allerdings nicht ungewöhnlich (G. Wrobel, pers. Mitteilungen). Um trotzdem auf direktem Wege Ratios bilden zu können, wurden in diesem Fall direkt die Intensitätswerte ohne Hintergrundkorrektur benutzt. (Im Falle, daß genau einer der beiden Kanäle im negativen Intensitätsbereich liegt, verschiebt sich sonst das Ratio.) Dies war weniger problematisch, da der Hintergrund im Bereich des Arrays relativ homogenen war.

Die aus den Intensitäten im Cy5-, bzw. Cy3-Kanal resultierenden Ratio-Werte sind in Diagramm 18 dargestellt.

Diagramm 18: Ratios von zwei Expression-Hybridisierung gebildet aus Cy3 / Cy5, Herz- / Pankreas-Intensitäts-Signalen. Die Normalisierung erfolgte durch Division durch den jeweiligen Gesamt-Ratio-Mittelwert der beiden Arrays. Die zweifache Standardabweichung dieses Mittelwertes ($0,96 \pm 0,54$) ist als grüne Region in das Diagramm eingetragen, um Bereich gleich-exprimierter Gene zu umschreiben.

Die Bezeichnungen der DNA-Ziele sind in Tab. 9 in Abschn. 3.4. erläutert.



Eine Normalisierung der Ratios mit Hilfe des Ratio-Mittelwertes einer definierten Kontrollgruppe konnte bei dieser Art von Untersuchung nicht angewendet werden, da keine gesicherten Aussagen über in Pankreas- und Herz-Gewebe gleichmäßig exprimierte Loci vorlagen. Die Ratios wurden deshalb zur Normalisierung durch den Mittelwert der Ratios sämtlicher auf dem Chip („Array 6“-Chip) vorhandener Zielstellen geteilt.

Auffällig ist eine Überexpression des *cMYC*-Gens in den Herz-Zellen im Vergleich zu Pankreas-Zellen, wie es am *cMYC*-cDNA-Ziel (*cMYC* 2), daß in erhöhter Konzentration (ca. 3 µg/µl) vorliegt abzulesen ist. Nähere Informationen zu dieser Beobachtung liegen nicht vor. Eine Bestätigung des Ergebnisses mit Hilfe einer quantitativen PCR (*Taqman*) konnte aus Zeitgründen im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden.

Sämtliche anderen cDNA-Hybridisierungsziele zeigen eine ausgeglichene Expression in den verglichenen Geweben an. Unter den PAC-Zielen zeigte sich eine relative Hochregulation des ATM-Lokus.