

cDNA-Microarray-Analyse von ZNS-Kaliumkanal defizienten Mäusen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Franziska Erxleben
aus Eurasburg

Würzburg 2010

Eingereicht am:.....
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Herrn Prof. Dr. Andreas Karschin danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik sowie sein Vertrauen in meine selbständige Arbeitsweise.

Herrn Prof. Dr. Stefan Gründer und Frau Prof. Dr. Schirmeister danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung beim Abschluss der Arbeit.

Dr. Volker Schmidt und Dr. Frank Döring danke ich für ihre fachliche Unterstützung, für die Bereitstellung der nötigen praktischen Mittel und die Weitergabe ihrer Laborerfahrung sowie die kameradschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen danke ich sehr Dr. Maruschka Weber, Prof. Dr. Erhard Wischmeyer und Dr. Frank Döring, sowie Anja Glück und Dr. Susanne Kneitz für die hervorragende Computerbetreuung, umfangreiche fachliche Unterstützung und ihre Freude an meinem Projekt.

Insbesondere danken möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei Heike Lorenz, Maria Oppmann, Brigitte Trost und Tanja Martini.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Maruschka Weber.

Ganz besonders danke ich natürlich meiner Mutter Dr. Helga Erxleben, die mir das Studium erst ermöglichte und mich jederzeit unterstützte.

| | |
|-----------|--|
| ActB | Beta-Aktin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B2m | Beta-2-Mikroglobulin |
| CCD | Charge-coupled device |
| CD1 | Wildtyp-Mausstamm |
| CHS1 | Chitinsynthase1 |
| CHS2 | Chitinsynthase2 |
| CTP | Cytosintriphosphat |
| DEPC | Diethylenepyrocarbonate |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxyTrinukleotidtriphosphat |
| DRG | Dorsal root ganglion |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FKS1 | Subunit of Beta-D-Glucan-Synthase |
| G6pd2 | Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-2 |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-phosphat-dehydrogenase |
| GAS1 | Beta-glucanosyltransferase |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GTP | Guanintriphosphat |
| Gus | Beta-Glucuronidase |
| Hprt | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| K2P | 2-Pore K+Channel (Tandem-Pore Domain K+Channel) |
| KCa | Ca-Depending K+Channel |
| Kcn | K+Channel nomenclature |
| Kir | Inward-Rectifying K+Channel |
| Kv | Voltage-depending K+Channel |
| NHS-Ester | N-Hydroxisuccinimid-Ester |
| PCR | Polymerasekettenreaktion, Polymerase Chain Reaction |
| Ppia | PeptidylprolylisomeraseA |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TASK | Tandem-Pore-Domain Acid-Sensitive K+Channel |
| Tfrc | Transferrin-Rezeptor C |
| THIK | Tandem-Pore Domain Halothane-inhibited K+Channel |
| TRAAK | Tandem-Pore Domain Arachidonic acic-stimulated K+Channel |
| TREK | TWIK-related K+Channel |
| TRESK | TWIK-related spinal cord K+Channel |
| TTP | Thymintriphosphat |
| Tuba | Alpha-Tubulin |
| TWIK | Tandem-Pore Domain Weak Inward Rectifier K+Channel |
| WT | Wildtyp |

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Zusammenfassung | 4 |
| 2. | Einleitung | 6 |
| 2.1 | Kaliumkanäle | 7 |
| 2.1.1 | Überblick | 7 |
| 2.1.2 | Physiologische Funktion und Kontrollmechanismen | 8 |
| 2.1.3 | Einteilung der Kaliumkanäle und Nomenklatur | 8 |
| 2.1.4 | Funktionsweise der Kaliumkanalpore | 11 |
| 2.1.5 | Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle | 12 |
| 2.1.6 | Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle | 14 |
| 2.2 | Die Microarray-Technologie und ihre Anwendung | 16 |
| 2.2.1 | Die Technologie | 16 |
| 2.2.2 | Die Anwendung | 18 |
| 2.3 | Zusammenfassung der Grundlagen | 21 |
| 3. | Material und Methoden | 23 |
| 3.1 | Entwicklung des Microarrays / Versuchsplanung | 23 |
| 3.1.1 | Microarray-Design | 23 |
| 3.1.2 | Auswahl der DNA-Sequenzen | 27 |
| 3.1.3 | Messplanung und Versuchsdesign | 32 |
| | <i>Grund-Experimente zur Versuchsvorbereitung</i> | 32 |
| | <i>Versuchdesign / Experimental Layout</i> | 33 |
| | <i>Poolen der RNA</i> | 36 |
| | <i>Replikate</i> | 36 |
| 3.2 | Methodenentwicklung und Testmessungen | 38 |
| 3.2.1 | Vergleich der Wildtyp-Stämme CD1 und C57/Black6 | 38 |
| 3.2.2 | Vergleich Gehirnabschnitte und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1 | 40 |
| | <i>Vergleich Cortex und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1</i> | 40 |
| | <i>Vergleich Kleinhirn und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1</i> | 43 |
| 3.3 | Auswertung und Datentransformation | 48 |
| 3.3.1 | Erfassung des Microarray-Bildes (Scannen) und Umwandlung in numerische Daten | 48 |
| 3.3.2 | Normalisierung | 53 |
| 3.3.3 | Datenanalyse bzw. Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede | 57 |
| 3.3.4 | Vergleich mehrerer Datensätze | 59 |
| 3.3.5 | Details zur Auswertung | 60 |

| | | |
|-------|---|-----|
| | <i>BioConductor / R-Projekt</i> | 60 |
| | <i>Konkordanzanalyse / Dye-Switch</i> | 60 |
| | <i>Filtergrenzen z. Ermittlung Regulierter Gene / Signifikanz</i> | 63 |
| 3.3.6 | Darstellung des Verlaufes einer Beispiel-Auswertung | 64 |
| 3.3.7 | Auswertung nach Wechsel in der Microarray-Charge | 70 |
| 3.4 | Material | 74 |
| 3.4.1 | Oligonukleotide (Primer) | 74 |
| 3.4.2 | Chemikalien / Solventien / Verbrauchsmaterial | 74 |
| 3.4.3 | Geräte / Kits | 75 |
| 3.4.4 | Software / Links | 76 |
| 3.5 | Molekularbiologische Methoden | 77 |
| 3.5.1 | PCR | 77 |
| 3.5.2 | Reverse Transkription | 78 |
| 3.5.3 | Isolierung von totalRNA aus Gewebe | 78 |
| 3.5.4 | Kontrolle isolierter Nukleinsäuren | 80 |
| 3.5.5 | Linearisierung klonierter DNA | 81 |
| 3.5.6 | Methoden: Microarray-Experiment | 84 |
| 3.5.7 | Probenverarbeitung bei Microarray-Experimenten mit sehr wenig totalRNA | 89 |
| 4. | Ergebnisse und Diskussion | 91 |
| 4.1 | Untersuchung der altersspezifischen Genexpression | 91 |
| 4.1.1 | Vergleich von adulten und 4-Tage-alten Tieren | 91 |
| 4.1.2 | Vergleich von adulten und 9-Tage-alten Tieren | 95 |
| 4.1.3 | Vergleich von adulten und 15-Tage-alten Tieren | 98 |
| 4.1.4 | Vergleich von adulten und 20-Tage-alten Tieren | 101 |
| 4.1.5 | Regulationsverlauf während der postnatalen Entwicklungsphase | 104 |
| 4.2 | Microarray-Analyse bei TRESK-Knockout-Mäusen | 111 |
| 4.2.1 | Kompensation im Gehirn | 111 |
| | <i>Vergleich Maus 153(TRESK-k.o.) und 162(C3H-WT)</i> | 111 |
| | <i>Vergleich der Knockout-Tiere 171/172 mit den Wildtyp-Tieren 203/204</i> | 116 |
| | <i>Ergebnisse weiterer Messungen zum Vergleich TRESK-Knockout- mit Wildtyp-Gehirn</i> | 120 |
| 4.2.2 | Kompensation im Rückenmark | 126 |

| | | |
|-------|-------------------------------|-----|
| 4.2.3 | Kompensation in den DRGs | 132 |
| 5. | Anhänge | |
| 5.1 | Literaturverzeichnis | |
| 5.2 | Die Kaliumkanäle im Überblick | |

1. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Erstellung eines „Kaliumkanal-Chips“, die Entwicklung einer geeigneten Messmethode und Auswertungsstrategie, die Durchführung von Testmessungen und die Untersuchung eines Knockout-Mausstammes auf den Genexpressionsstatus und die auftretenden Kompensationsmechanismen.

Am Beginn der Arbeit stand vor allem die Auswahl der zu untersuchenden Kaliumkanal-Gene und die Sammlung von Sequenz-Informationen. Ausgehend davon konnte die cDNA-Microarray-Technologie als Methode der Wahl bestimmt werden und die entsprechenden Vorbereitungen für die Umsetzung getroffen werden.

Die ersten Messungen im Zuge der Methodenentwicklungen zeigten vor allem, dass jeder Microarray seine individuellen Probleme mit sich bringt, ließen jedoch auch schon erahnen, welche umfangreichen Möglichkeiten diese Technologie bietet. Dann folgten Versuchsmessreihen, wie die Untersuchung der Altersspezifischen Expression und der Vergleich von bestimmten Gehirnabschnitten mit dem Gesamtgehirn. Den Abschluss bildete die Messung der TRESK-Knockout-Mauslinie im Vergleich zu ihrem Wildtyp. Hier stand die Frage nach möglichen Kompensationsmechanismen im Vordergrund. Mit *knk16* haben die Messungen einen interessanten Kandidaten aus der gleichen Genfamilie geliefert, dessen Funktion und Kompensationsvermögen nun in weiteren Tests zu untersuchen ist.

Die Arbeit hat gezeigt, dass der Einsatz der Microarray-Technologie zur Untersuchung von Genexpressionsdaten bei Ionenkanalfamilien geeignet ist. Das Fundament der Microarrayanalyse von Kaliumkanälen mit einem individuell entwickelten Microarray ist zum einen das Wissen um Genetik und Funktion der Kaliumkanäle und zum anderen die Technologie, die eine solche Analyse möglich macht. Die Tatsache, dass Säugerorganismen wie Maus und Mensch eine solch hohe Zahl an Kaliumkanälen entwickelt haben und im ständigen Zellstoffwechsel in umfassender Form einsetzen, zeigt die Bedeutung dieser Ionenkanalfamilie und macht die Forschung an diesen Kanälen so interessant und wichtig für die medizinische Grundlagenforschung. Eine Vielzahl von Krankheiten kann schon jetzt direkt oder indirekt auf Gendefekte bei Kaliumkanal-Genen zurückgeführt werden.

Mit der Microarray-Analyse steht nun eine Technologie zu Verfügung, die es ermöglicht, die Expression dieser Gene direkt zu untersuchen und mögliche Kompensationsvorgänge aufzudecken. Damit können Zusammenhänge ermittelt werden, die die Grundlage für weitere Forschungen sein können, mit deren Hilfe wir Krankheiten wie Depression eines Tages wirklich verstehen und behandeln können.

1. Abstract

The aims of this dissertation were the creation of a „potassium channel chip“, the development of adequate measurement method and strategy of analysis, the performance of developmental experiments and the analysis of the status of genexpression and the occurring mechanisms of compensation in a knockout mouse stem.

In beginning the selection of the potassium channel genes to be considered as interesting part of the microarray and the compilation of the sequence information was the main part of the work. Starting from this the choice of the adequate cDNA-microarray-technology and the preparation of the implementation was possible.

The first experiments performed in the course of the method development have given a hint on the problems connected with every microarray. However they also have shown the great possibilities of the microarray technology. In the following series of measurements like the investigation of variation of expression during the juvenile development and the comparison of different parts of the brain with the whole brain were performed. The studies were completed by the investigation of the TRESK-Knockout mouse stem in comparison to its wild type. The centre of these studies was the question for possible mechanisms of compensation. As a result *kcnk16* - being part of the same gene family as TRESK - can be named as an interesting candidate to be investigated for its function and capacity of compensation in the future.

In my dissertation I was able to show that the microarray technology is an adequate method for the comparison of genexpression between members of ion channel families. The bases of the microarray analysis of potassium channels with a individually designed microarray are on the one side the knowledge of the genetics and function of the potassium channels and on the other side the technology which allows this kind of analysis. The fact that mammalian organism like mouse and human have developed such a great number of potassium channels and are using these in the regular cell metabolism in a comprehensive way shows the importance of this ion channel family and makes the research on these channels so interesting and important for fundamental research. A multiplicity of diseases can be attributed indirectly or directly to gene malfunctions in potassium channels. With microarray a technology is available, which permits to investigate the expression of these genes directly and to discover possible ways of compensation. By this coherences can be identified being the basis for continuative research which one day will make it possible to really understand and treat diseases like depression.

2. Einleitung

Die Kaliumkanäle als größte bekannte Ionenkanalfamilie spielen eine entscheidende Rolle bei vielen Zellvorgängen. Ihre divergente Funktionalität und ihr unterschiedlicher Aufbau geben Anlass zu verschiedensten Forschungsansätzen. Aufbau, Grundfunktion und Regulationsmechanismen lassen sich in einem gewissen Maß in *In-vitro*-Systemen bzw. in heterologen Expressions-Systemen wie den Oozyten untersuchen. Allerdings lassen sich viele Ergebnisse, die so über Ionenkanäle gewonnen werden, nur bedingt auf Ionenkanäle im funktionellen Gewebe übertragen. Zur Klärung der *In-vivo*-Funktionalität werden deshalb vermehrt Knockout-Tiere eingesetzt. Diese können über das Ausschalten einzelner Gene und über die Untersuchung der Konsequenzen solcher Ausfälle Hinweise auf mögliche Stoffwechselforgänge und Vernetzungen der Ionenkanäle untereinander geben.

Hierbei steht vor allem bei Tieren, die keine oder nur geringe Reaktion auf das Ausschalten einzelner Gene zeigen, eine Erforschung der Kompensationsmechanismen im Vordergrund. Zur Untersuchung der Knockout-Tiere bieten sich verschiedenste Technologien und Methoden an, die sich gegenseitig ergänzen und so eine umfangreiche Charakterisierung der Tiere ermöglichen.

Eine der wesentlichen Methoden hierzu ist die *In-situ*-Hybridisierung. Hierbei kann ermittelt werden, in welchen Geweben und Gewebestrukturen bestimmte Kaliumkanäle exprimiert werden bzw. als Protein in der Zellmembran vorliegen.

Ergänzend dazu kann über ein Einzelzell-Assay die Genexpression in einzelnen Zellen untersucht werden.

Beide Methoden werden hauptsächlich auf Kaliumkanäle ausgerichtet werden, die entweder aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Struktur und Funktion oder aber aufgrund von Vorversuchen als mögliche Kompensationskandidaten angenommen werden.

Eine dritte Methode ist die elektrophysiologische Untersuchung in Hirschnittpräparaten der Knockout-Tiere. Mit Hilfe der *Whole-cell Patch Clamp* Analyse kann auf Kompensationsmechanismen geschlossen werden, da bei Kenntnis der Kanaleigenschaften eine Zuordnung des makroskopischen Stromes zu bestimmten Kanaluntereinheiten möglich ist.

Diese Verfahren auf Zell- bzw. Gewebeebene können durch Verhaltenstests ergänzt werden. Dabei können auch sonst verhaltensunauffällige Tiere Abweichungen in lokomotorischer



Aktivität, Koordinationsvermögen, Schmerzwahrnehmung und bei logischen, räumlichen und aversiven Lernvorgängen zeigen.

Wie zuvor beschrieben, basieren viele dieser Methoden auf Vorkenntnissen hinsichtlich Verteilung der Kaliumkanäle, Genexpressionsmuster, Aufbau, Funktionalität und Ähnlichkeit der Kaliumkanal-Gene bzw. -Proteine untereinander. Die DNA-Microarray-Technologie ist in der Lage, ohne all diese Voraussetzungen semiquantitative Aussagen zum Genexpressionsstatus aller Kaliumkanäle zu einem bestimmten Zeitpunkt geben zu können. Damit ist sie prädestiniert für die Analyse von Kompensationsmechanismen und kann idealerweise als Screeningmethode für die Suche nach Kandidaten eingesetzt werden, die dann mit Hilfe anderer Methoden gezielt untersucht werden.

Im Folgenden wird ein Überblick über den derzeitigen Stand der Kenntnis zu den Kaliumkanälen gegeben und die Hintergründe der Microarray-Technologie dargestellt.

2.1 Kaliumkanäle

2.1.1 Überblick

Kaliumkanäle kann man ohne Zweifel als herausragende Ionenkanalfamilie bezeichnen. Diese „uralten“ Proteine sind ubiquitär verbreitet – sowohl hinsichtlich der Spezies als auch im Organismus. Alle bis jetzt vollständig sequenzierten Genome – sei es bei Eukaryoten, Eubakterien oder Archeae – zeigen mindestens einen Kaliumkanal [0001]. Bei Maus und Mensch ist die Zahl der derzeit bekannten Kaliumkanäle sogar auf knapp 100 angewachsen und damit stellen die Kaliumkanäle die größte Ionenkanalfamilie dar. Zugleich sind die Kaliumkanäle aber auch innerhalb des einzelnen Organismus weit verbreitet und kommen in unterschiedlicher Struktur und Funktion in fast jeder Zelle vor [0001].

Dabei unterscheiden die Kaliumkanäle sich untereinander recht stark hinsichtlich ihres Aufbaus, der Funktion und der Kontrollmechanismen (vgl. 2.1.2). Allen gemeinsam ist eine hohe Kaliumselektivität, die im Aufbau der Kanalpore begründet liegt (vgl. 2.1.4).

Der Ausfall eines einzelnen Kaliumkanal-Gens kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Beim Menschen sind z.B. Arrhythmien, Taubheit, Diabetes, Epilepsie und Fehlregulationen des Blutdrucks auf Fehler in der Gensequenz eines bestimmten Kaliumkanals zurückzuführen [0001].

2.1.2 Physiologische Funktion und Kontrollmechanismen

Einfach ausgedrückt ist die Grundfunktion aller Kaliumkanäle die Erlangung der spezifischen und kontrollierbaren Durchlässigkeit von Zellmembranen für Kalium-Ionen. Aufgrund des hohen Konzentrationsunterschiedes von Kalium-Ionen im Zytoplasma und extrazellulären Raum hat die Durchlässigkeit der Zellmembran für Kalium-Ionen einen großen Einfluss auf das Membranpotential und damit auf die Funktion der gesamten Zelle. Die Bereitstellung einer selektiven „einfachen Pore“ führt aufgrund des Konzentrationsgefälles zum Kaliumausstrom und damit zu einem negativen Membranpotential (Hyperpolarisation). Dieser Vorgang ist als grundlegende Kaliumkanalfunktion für die Erhaltung des Ruhepotenzials sowie für die Repolarisation nach einem Aktionspotential in elektrisch erregbaren Zellen wie Nervenzellen, Muskelzellen usw. wichtig. Im zellulären Kontext geht die Funktion vieler Kaliumkanäle aber aufgrund raffinierter Regulationsmechanismen über diese „einfache Pore“ hinaus und spielt sowohl in elektrisch erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen eine wichtige Rolle. Beispiele dafür sind das „Kalium-Recycling“ für den Elektrolyt-Haushalt des Körpers im Nierenepithel, die Hyperpolarisation in T- und B-Zellen, welche Voraussetzung für die Mechanismen zur Immunantwort ist und die Erythrozyten, die für die Regulation ihres Volumens und ihrer Zellform Kaliumkanäle einsetzen.

Darüber hinaus muss man natürlich die enorme Bedeutung der Kaliumkanäle für das Nervensystem hervorheben, wo sie über die Regulation der Zellmembranpotentiale direkten Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit nehmen [0401].

Diese Beispiele verdeutlichen die funktionelle Divergenz innerhalb der Kaliumkanalfamilie, die eine große funktionelle Vielfalt der Kaliumkanäle voraussetzt. Diese wird von verschiedenen Faktoren begünstigt. Zum einen natürlich von den strukturellen Unterschieden, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, zum anderen von zwei sehr gezielt wirkenden Regulationsmechanismen: gewebespezifische Kontrolle der Transkription und Einfluss biochemischer Faktoren und Moleküle auf die Kanalproteine. Die wichtigsten Faktoren, die je nach Kanaltyp Einfluss nehmen, sind Spannungsänderungen, Calcium-Konzentration, pH-Wert, G-Proteine, Polyamine und Phosphorylierung [0001].

2.1.3 Einteilung der Kaliumkanäle und Nomenklatur

Die Kalium-Ionenkanalfamilie wird aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede in Unterfamilien eingeteilt. Man unterscheidet spannungsabhängige (K_V), calciumgesteuerte (K_{Ca}), einwärtsgleichrichtende (K_{ir}) und 2-Poren-Domänen- (K_{2P}) Kaliumkanäle. Wie

aufgrund der Vielfalt der Kaliumkanäle zu erwarten ist, zeigt sich auf genomischer Ebene kein Muster in Verteilung und Sequenz [0001]. Fast alle beim Menschen bekannten Kaliumkanal-Gene unterliegen einem vielfachen Splicing [0001]. In manchen Fällen liegt der codierende Bereich innerhalb eines Exons, in anderen Fällen verteilt er sich über viele Exone. Auch eine chromosomale Clusterbildung ist nicht nachzuweisen [0001].

Die **spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v)** umfassen mit derzeit gut 40 bekannten Kanalproteinen die größte Gruppe. Sie waren die ersten klassifizierten und näher untersuchten Kaliumkanäle, so dass ihre Funktion weitestgehend bekannt ist. Es handelt sich um Tetramere, die aus vier gleichen oder unterschiedlichen α -Untereinheiten aufgebaut sind. Es ergibt sich eine Kleeblattstruktur mit der Pore in der Mitte. Strukturell bestehen die Untereinheiten aus sechs Transmembran-Helices. Zwei Bereiche in jedem Protein sind für die wichtigsten Funktionen des aus vier Proteinen zusammengefügt Kanals verantwortlich: die S4-Sequenz für die Spannungsabhängigkeit und die „Signatursequenz“ für die Kaliumselektivität.

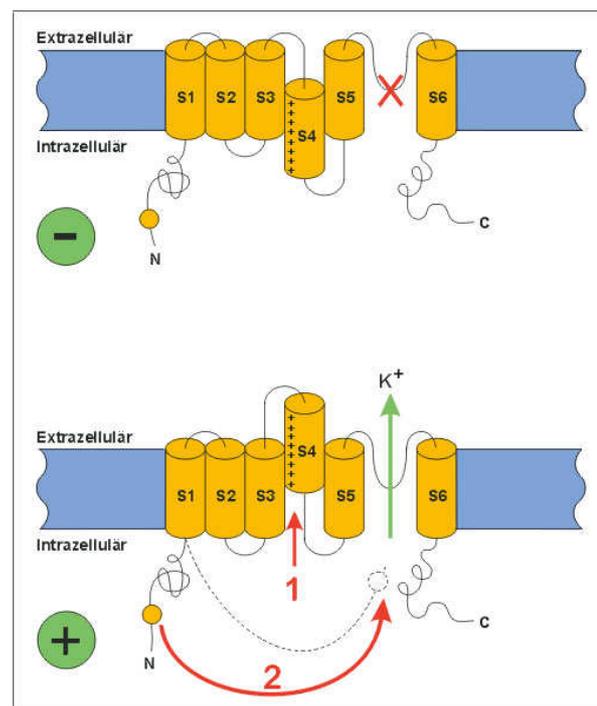


Abb.2-1 Aufbau und Funktion
eines spannungsabhängigen Kaliumkanals
(aus „Vorlesungsskripte Zoophysiology –
Regulation von Ionenkanälen“ – mit
freundlicher Genehmigung des Autors)

Die S4-Sequenz befindet sich in der vierten Transmembranhelix. Sie weist in regelmäßiger Abfolge in jeder dritten oder vierten Position Lysin oder Arginin auf, während die restlichen Aminosäuren in diesem Bereich hydrophob sind. Die Signatursequenz (TMxTVGYG) befindet sich zwischen den Transmembran-Helices S5 und S6. Sie kommt mit geringfügigen Abweichungen in jedem Kaliumkanalprotein vor und bildet gemeinsam mit den Helices S5 und S6 den Kontrollmechanismus für die Kaliumselektivität. Im N-terminalen Bereich der

Helix S1 befindet sich bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen außerdem die T1-Region. Sie ist hochkonserviert und ist zuständig für das Andocken der β -Untereinheiten, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [0001].

Die **calciumgesteuerten Kaliumkanäle (K_{Ca})** unterscheiden sich von den K_V -Kanälen nur in einem zusätzlichen Transmembransegment bei den K_{Ca} -Kanäle, das für die Calcium-Steuerung zuständig ist [0001].

Die **einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (K_{ir}/K_{ir})** bilden ebenfalls Tetramere aus gleichen oder unterschiedlichen Untereinheiten, die in diesem Falle nur zwei Transmembran-Helices aufweisen [9701].

Die **Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle (K_{2P}/K_{2P})** weisen, wie ihr Name schon sagt, in einer Untereinheit zwei Poren-Domänen auf. Folglich wird ein Kanal aus nur zwei Untereinheiten gebildet [0101,0102].

Aufbau und Funktion der Einwärtsgleichrichter und der 2P-Domänen-Kanäle werden in separaten Unterkapiteln ausführlicher beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.5 / 2.1.6)

Zu Beginn der Entdeckung und Erforschung der Kaliumkanäle wurden die Proteine meist aufgrund ihrer Funktion oder Lokalisation benannt. Außerdem erfolgte die Einteilung in die vier oben genannten Gruppen. Mit der Zahl der entdeckten Gene wurde eine deutliche Abgrenzung und in Bezugsetzung der Gene und Proteine untereinander mit Hilfe dieser Nomenklatur immer schwieriger. Vor einigen Jahren wurde deshalb eine neue übergreifende Nomenklatur eingeführt, die eine genauere Unterteilung nach Struktur- und Funktionsmöglichkeiten eröffnet. Diese Nomenklatur hat sich im Bereich der Gen-Benennung durchgesetzt, die Kanalproteine an sich werden aber meist noch mit ihrem alten Namen bezeichnet (siehe Anhang 2).

Die Namen der Kaliumkanal-Gene setzen sich aus „kcn“ und einem Buchstaben, der die Familie beschreibt, sowie einer Ziffer zusammen; z.B. *kcna1*: Gen der Kalium-Ionenkanalfamilie A, Gen 1. Abb.2-1 zeigt den phylogenetischen Baum aller derzeit bekannten Kaliumkanal-Gene ohne β -Untereinheiten. Bei der Familie der *kcnk*-Gene handelt es sich um 2P-Domänen-Kanäle, bei *kcnj*-Genen um K_{ir} -Kanäle und bei *kcnk*, *kcnma* und *kcnt* um calciumgesteuerte Kaliumkanäle. Alle anderen Familien umfassen spannungsabhängige Kaliumkanäle.

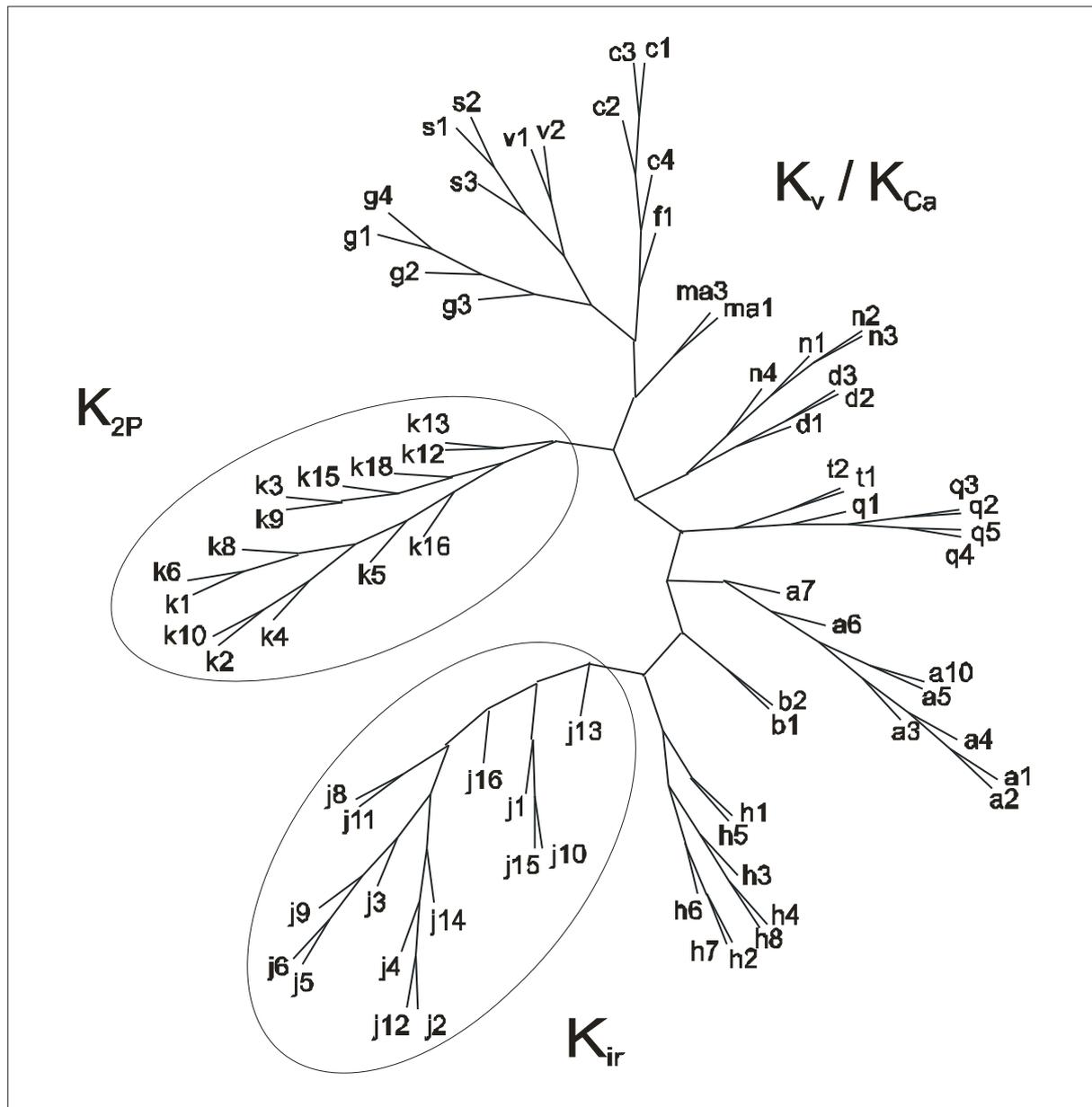


Abb.2-2 Kaliumkanalbaum aller Kaliumkanäle,
Alignment nach Clustal V,
Ausgabe als phylogenetischer Baum

2.1.4 Funktionsweise der Kaliumkanalpore

Die Pore eines jeden Kaliumkanals, egal welchen Subtyps, zeichnet sich durch eine sehr hohe Kaliumselektivität aus. Zugleich weisen Kaliumkanäle aber auch eine erstaunlich hohe Durchsatzrate auf. Dafür sind zwei Faktoren verantwortlich: die präzise koordinierte Leitung des dehydrierten Kalium-Ions durch die Pore und die Fähigkeit mehrere Ionen gleichzeitig hintereinander durch die Pore leiten zu können.

Grundlegend für die Funktion des Kaliumkanals ist die oben genannte Signatursequenz. Sie enthält sehr viele Aminosäuren mit freien Carbonylgruppen, die aufgrund ihrer Anordnung im Raum einen „Korb“ bilden, in den ein dehydriertes Kalium-Ion genau hineinpasst. Für Natrium-Ionen ist der Korb zu groß, weshalb eine Einlagerung eines dehydrierten Natrium-Ions energetisch zu ungünstig wäre. Auf diese Weise wird die hohe Kaliumselektivität erreicht, wobei die hohe Affinität der Kalium-Ionen zum Korb aber eher hinderlich für eine schnelle Durchsatzrate des Kanals ist. Dieses Problem wird gelöst, indem sich auf dem Weg des Ions durch die Kanalpore in direkter Nähe zum Korb weitere Ionen-Bindungsstellen befinden, die das Ion durch den Kanal leiten. Außerdem beschleunigt die elektrostatische Abstoßung der immer wieder vom Korb aus in den Kanal hineinkommenden Kalium-Ionen den Durchfluss durch die Kanalpore [0001].

2.1.5 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

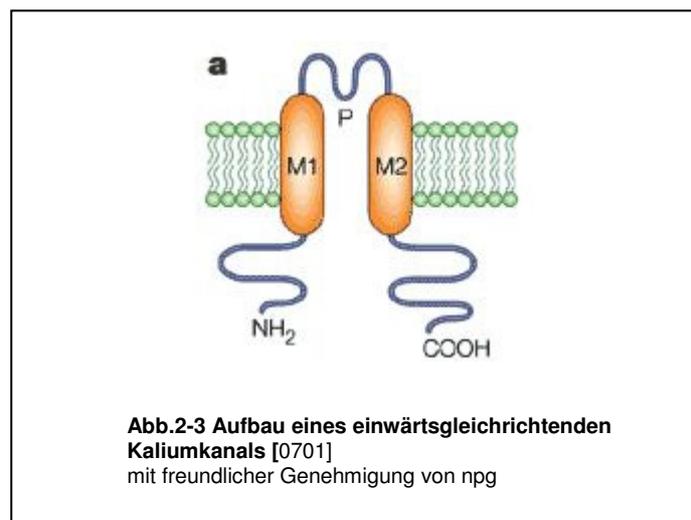
Diese Kaliumkanäle scheinen entwicklungsgeschichtlich betrachtet eine sehr frühe Form von Kanalproteinen zu sein [9701].

Ihre Untereinheiten besitzen wie oben beschrieben nur zwei transmembranäre Segmente, welche um eine porenbildende Proteinschleife angeordnet sind. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle lassen Kalium-Ionen leichter in die Zelle hinein als aus der Zelle heraus.

Die einwärtsgleichrichtende

Funktion der K_{ir} -Kanäle ist eine energetisch äußerst günstige Variante der Kalium-Ionen- und damit auch Membranpotential-Regulation, was vor allem in lang anhaltend erregten Zellen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Membranpotentials spielt [9701].

Die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle zeigen große funktionelle Variabilität. Verantwortlich dafür sind verschiedene Mechanismen, wie alternatives Spleißen, Bildung heteromerer Kanalproteine und die Assoziation mit anderen Membranproteinen.



In Tab.2-1 sind die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle in der kcn-Nomenklatur, ihrer ursprünglichen Gen-Bezeichnung und ihrem Protein-Namen erfasst. Aufgrund von Ähnlichkeiten im Aufbau des Proteins und der Proteinfunktion lassen sich die Kir-Kanäle in fünf Gruppen unterteilen [9701]:

Kir1-Kanäle (Kir1.1, Kir1.2, Kir1.3), schwach gleichrichtend, reguliert über pH-Wert und zytoplasmatisches ATP (außer Kir1.3).

Kir2-Kanäle (IRK), stark gleichrichtend aufgrund des spannungsabhängigen Blocks durch intrazelluläre Proteine.

Kir3-Kanäle (GIRK), hauptsächlich exprimiert in Gehirn und Herz, aktiviert durch G β γ -Untereinheiten.

Kir5.1-Kanäle, unterscheiden sich in ihrer Primärsequenz stark von den anderen Mitgliedern der Kir-Familie.

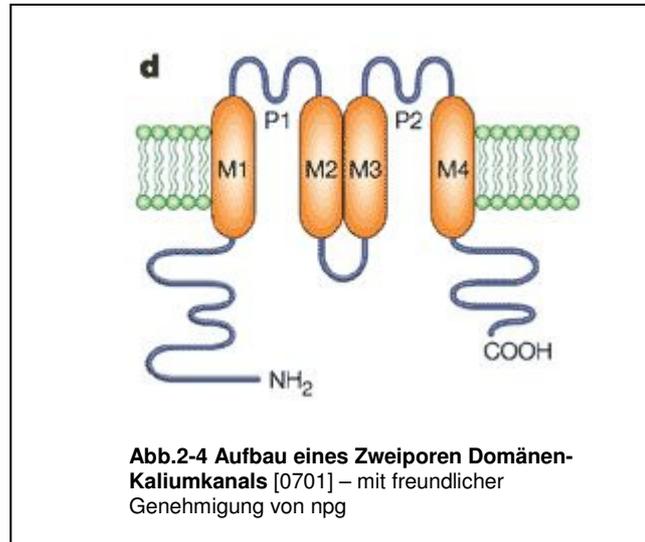
Kir6-Kanäle, weit verbreitet, hemmbar durch intrazelluläres ATP, unter Interaktion mit den Rezeptoren für Sulfonylharnstoffe Bildung von K_{ATP}-Kanälen.

| | | |
|--------|--------------------|-------|
| Kcnj1 | Kir1.1 | |
| Kcnj2 | Kir2.1 | IRK1 |
| Kcnj3 | Kir3.1 | GIRK1 |
| Kcnj4 | Kir2.3 | IRK3 |
| Kcnj5 | Kir3.4 | GIRK4 |
| Kcnj6 | Kir3.2 | GIRK2 |
| Kcnj8 | Kir6.1 | |
| Kcnj9 | Kir3.3 | GIRK3 |
| Kcnj10 | Kir1.2 (Kir4.1) | |
| Kcnj11 | Kir6.2 | |
| Kcnj12 | Kir2.2 | IRK |
| Kcnj13 | Kir7.1 | |
| Kcnj14 | Kir2.4 | |
| Kcnj15 | Kir4.2 | ROMK3 |
| Kcnj16 | Kir5.1 | |

Tab.2-1 einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle
kcn-Nomenklatur, ursprüngliche Genbezeichnung,
Name des Proteins aufgrund der Funktion

2.1.6 Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle

Innerhalb der großen Kalium-Ionenkanalfamilie stellen die Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle - auch Tandemporen-Domänen Kalium-Kanäle genannt - die Unterfamilie mit der größten Vielfalt dar [0101,0102]. Allen 2P-Domänen-Kanälen gleich ist ihre Struktur und ihre grundlegende Funktion: sie setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, von denen beide jeweils zwei Porensegmente besitzen (siehe Abb.2-3), so dass letztendlich wie bei allen anderen Kaliumkanälen wieder vier Porensegmente für die Bildung der Kanalpore verantwortlich sind.



Ihre Hauptaufgabe ist die Generierung einer Leckleitfähigkeit, die bei der Stabilisierung des Ruhepotentials und

bei der Entstehung und Weiterleitung des Aktionspotentials in Säugerneuronen eine wichtige Rolle spielt [0101]. Ihre idealisierte Funktion als Membranpore mit der oben beschriebenen typischen Kalium-Selektivität ist weitestgehend zeit- und spannungsunabhängig, was auf einige der Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle zutrifft. Das elektrophysiologische Verhalten eines typischen Leckkanals lässt sich mit der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung beschreiben [0101]. Aber nicht alle Leckkanäle folgen diesem idealisierten Muster, sondern zeigen eine weitaus größere funktionelle Vielfalt. Beispielsweise zeitabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungskomponenten (z.B. TASK2, THIK1), schwach auswärtsgerichtendes (z.B. TASK2, TALK1) oder einwärtsgerichtendes (z.B. TWIK1/2) Verhalten [0101,0102]. Fast alle Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle sind durch verschiedenste Faktoren wie Hitze, pH-Wert, mechanischer Stress und Moleküle wie Fettsäuren, Phospholipide und Inhalationsanästhetika beeinflussbar [0102].

In Tab.2-2 sind die 2P-Domänen Kaliumkanäle in der kcn-Nomenklatur, ihrer alten Gen-Bezeichnung und ihrem Protein-Namen erfasst. Wie man an der Protein-Nomenklatur gut erkennen kann, lassen sich die Zweiporen-Domänen-Kanäle in sechs Gruppen einteilen, deren Mitglieder in mindestens einem funktionellen Merkmal übereinstimmen, das aus dem Namen herauszulesen ist [0101].

Im Einzelnen sind das [0101]:

THIK für *Tandem-Pore Domain Halothane-Inhibited K⁺ Channels*,

TASK für *Tandem-Pore Domain Acid-Sensitive K⁺ Channels*,

TWIK für *Tandem-Pore Domain Weak Inward Rectifier K⁺ Channels*,

TREK für *TWIK-Related K⁺ Channels*

TRAAK für *Tandem-Pore Domain Arachidonic acid-stimulated K⁺ Channels*.

TRESK für *TWIK-related spinal cord K⁺ Channel*.

| | | |
|--------|------------------|----------------|
| Kcnk1 | K2P1.1 | TWIK1 |
| Kcnk2 | K2P2.1 | TREK1 |
| Kcnk3 | K2P3.1 | TASK1 |
| Kcnk4 | K2P4.1 | TRAAK |
| Kcnk5 | K2P5.1 | TASK2 |
| Kcnk6 | K2P6.1 | TWIK2 |
| Kcnk8 | K2P7.1 | |
| Kcnk9 | K2P9.1 | TASK3 |
| Kcnk10 | K2P10.1 | TREK2 |
| Kcnk12 | K2P12.1 | THIK2 |
| Kcnk13 | K2P13.1 | THIK1 |
| Kcnk15 | K2P15.1 | TASK5 |
| Kcnk16 | K2P16.1 | TALK1 |
| Kcnk17 | K2P17.1 human | TALK2 TASK4 |
| Kcnk18 | K2P18.1 | TRESK |

Tab2-2 einwärtsgerichtete Kaliumkanäle
kcn-Nomenklatur, ursprüngliche Genbezeichnung,
Name des Proteins aufgrund der Funktion

Bezeichnend für die Familie der Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle ist also ihre enorme Heterogenität sowohl hinsichtlich der Primärsequenz als auch in Aufbau und Funktion. Zwar ist ihnen allen der allgemeine und hochkonservierte Grundkörper gemein, sie unterscheiden sich jedoch im Einzelnen so deutlich, dass sie auf die oben beschriebenen Regulationsfaktoren sehr unterschiedlich reagieren. Die Verwandtschaft und Homologie der Kanäle zueinander ist in Abb.2-2 dargestellt.

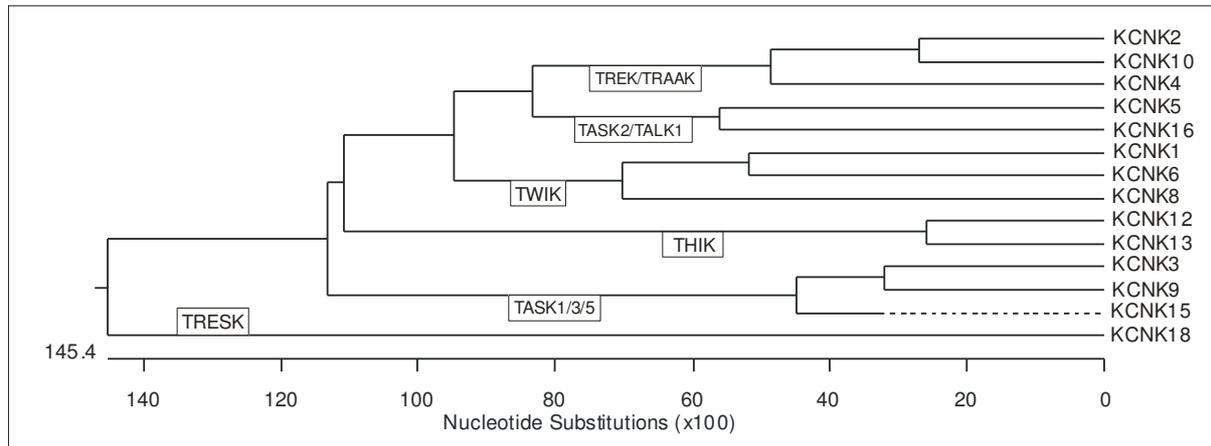


Abb.2-2 Kaliumkanalbaum aller Kaliumkanäle,
Alignment nach Clustal V,
Ausgabe als phylogenetischer Baum

Sehr interessant bei diesen Kanälen ist auch der Vergleich von Mensch und Maus. Über die Primärsequenz sind die homologen Beziehungen zwischen Mensch- und Maus-Kanal noch recht gut zuzuordnen, vergleicht man dann aber die Reaktion auf verschiedene Regulationsfaktoren, so entdeckt man teilweise Unterschiede. Außerdem konnte beispielsweise der humane Leckkanal TALK2 bei der Maus nicht nachgewiesen werden. Die mit über 80% recht homologe Primärsequenz konnte zwar im Genom gefunden werden, befand sich aber auf zwei unterschiedlichen Chromosomen, so dass man von einem Chromosomenbruch ausgehen muss, aufgrund dessen der Maus-TALK2 im Laufe der Evolution inaktiv wurde.

2.2 Die Microarray-Technologie und ihre Anwendung

2.2.1 Die Technologie

Der Begriff Microarray leitet sich aus zwei Grundbegriffen ab. Zum einen vom Microchip aus der Halbleiter- und Microsystemtechnik aufgrund der geringen Größe gepaart mit großer Datenkapazität. Zum anderen von dem Begriff Array, was in der Molekularbiologie eine zweidimensionale Anordnung von Biomolekülen auf einer Festkörperoberfläche beschreibt. Ihren Ursprung hat diese Technologie in einer Weiterentwicklung der Southern-Blot-Methode, welche ungefähr im Jahre 1990 zum Microarray umgesetzt wurde. Zu Beginn wurde als Festkörperoberfläche Glas eingesetzt, welches inzwischen von verschiedenen beschichteten Glaträgern und Kunststoffen abgelöst wurde [0003].

Die Einteilung der Microarray-Technologie in ihre unterschiedlichen Anwendungen erfolgt aber weniger nach der Trägeroberfläche (*Substrat*), als nach den aufgetragenen Sonden (*probes*). Im Wesentlichen wird dafür DNA eingesetzt, aber mittlerweile sind auch schon RNA und Proteine als Sonden nutzbar. Ein sehr ausführlicher Überblick über die Anwendung der Microarray-Technologie im akademischen Umfeld findet sich bei Cheung [9901].

Beim Einsatz von DNA als Sonde kann man wiederum mehrere Methoden unterscheiden: die Affymetrix-Arrays, Oligomer-Arrays und cDNA-Microarrays [9903].

Affymetrix bietet zur Zeit Arrays mit DNA-Oligomeren für das gesamte humane Genom an und verspricht in Zukunft auch Arrays für in der Forschung eingesetzte Tiere, z.B. der Maus, anbieten zu können. Affymetrix verwendet zur Herstellung der Arrays eine Art „in situ Synthese“ [9903]. Dabei werden die synthetischen Oligonukleotide auf einer definierten Stelle des Oberflächensubstrates mit Hilfe der Photolithografischen Synthese schrittweise aus ihren Nukleotiden aufgebaut. Die Sonden sind 25-Mere und binden damit auch recht kleine DNA-Segmente. Bereits 1-2 falsche Basen können zu Kreuzhybridisierungen führen. Vorteil der Affymetrix-Methode ist die enorme Sonden-Anzahl pro Array, so dass diese Form des Microarrays hauptsächlich als „Grob-Screening“ Anwendung findet.

Der Einsatz von „*custom-made*“ Oligomer-Arrays ist inzwischen die am häufigsten verwendete Methode [0002]. Hier werden vorsynthetisierte 50-80-Mere auf das Oberflächensubstrat aufgebracht („ex situ Synthese“) [9903]. Dazu werden die DNA-Segmente in einem Auftragspuffer gelöst und dann entsprechend einem festgelegten Muster gespottet und anschließend immobilisiert. Das Spotten kann per Kontaktdruckverfahren (z.B. *Contact Tip Deposition Printing*) oder per kontaktfreiem Verfahren (z.B. piezoelektrisches Spotten) erfolgen. Diese Oligomer-Arrays erreichen nicht ganz den Datenumsatz wie die Affymetrix-Arrays, bieten aber dem Anwender die Möglichkeit selbständig Arrays kleinerer Genome wie z.B. bakterielle Genome zu spotten. Ihre Spezifität ist relativ hoch, wobei Ähnlichkeiten von über 75% zu Kreuzhybridisierungen führen können und bei Ähnlichkeiten über 90% sicher falsch positive Ergebnisse auftreten [0002].

Microarrayanwender mit einer eng umrissenen Anzahl von zu untersuchenden Genen verwenden meist cDNA-Arrays. In diesem Fall werden ebenfalls per „ex situ Synthese“ durch PCR gewonnene DNA-Segmente mit ca. 250-2000 Basen als Sonden auf der Festkörperoberfläche eingesetzt [9902]. Unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen kann mit diesem Verfahren eine hohe Spezifität erreicht werden, die zu Abweichungen von weniger als 10% im Messergebnis führt.

Abb.2-3 zeigt einen Spot-ausschnitt eines cDNA-Microarrays, der per Röntgenstrukturanalyse aufgenommen wurde [9902].

Die DNA-Stränge bilden offensichtlich nicht nur Doppelstränge, sondern lagern sich im Spot zu parallelen Mustern zusammen.

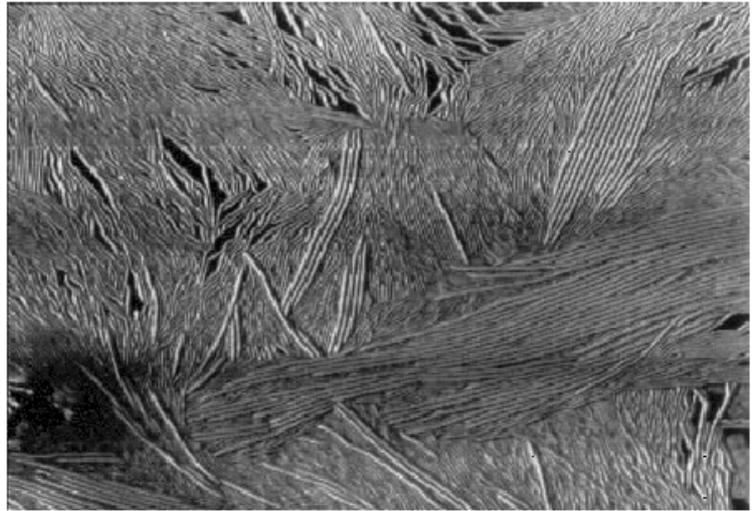


Abb.2-3 Röntgenstrukturanalyse eines Spots,
Parallele Lagerung der DNA-Stränge [9902] –
mit freundlicher Genehmigung von npg

cDNA-Microarray und Oligomer-Arrays (*custom*) unterscheiden sich von der Affymetrix-Methode nicht nur in der Herstellung der Arrays, sondern auch in der Hybridisierungstechnologie. Bei beiden *custom*-Microarray-Methoden werden üblicherweise Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, welche eine gleichzeitige Untersuchung von zwei zu testenden cDNA-Proben auf einem Array in einem Versuchsansatz zulassen (Co-Hybridisierung oder kompetitive Hybridisierung). Der Vorteil dieser Anwendung liegt in der enormen Reduktion der Fehlerquellen.

Wir haben uns in der Phase des Versuchs-Designs für cDNA-Microarrays entschieden. Auf die Gründe wird im Bereich Versuchsplanung und Microarray-Design eingegangen (vgl. Kapitel 3.1).

2.2.2 Die Anwendung

Grundlage einer Microarray-Messung ist wie eben beschrieben der mit Sonden bespottete und prähybridisierte Array (*slide*). Als Untersuchungsmaterial (*target*) kann Gesamt-RNA (totalRNA), mRNA oder microRNA zum Einsatz kommen.

In Abb.2-4 wird der Verlauf eines Microarray-Experimentes dargestellt [9902].

Die zu untersuchende RNA wird mit Hilfe von Reversen Transkriptasen in DNA umgeschrieben. Dabei kommen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiv markierte Nukleotide zum Einsatz, die in die neu gebildete DNA eingebaut werden. Alternativ können sich an den Nukleotiden Linker befinden, die eine nachträgliche Kopplung von Farbstoffen ermöglichen.

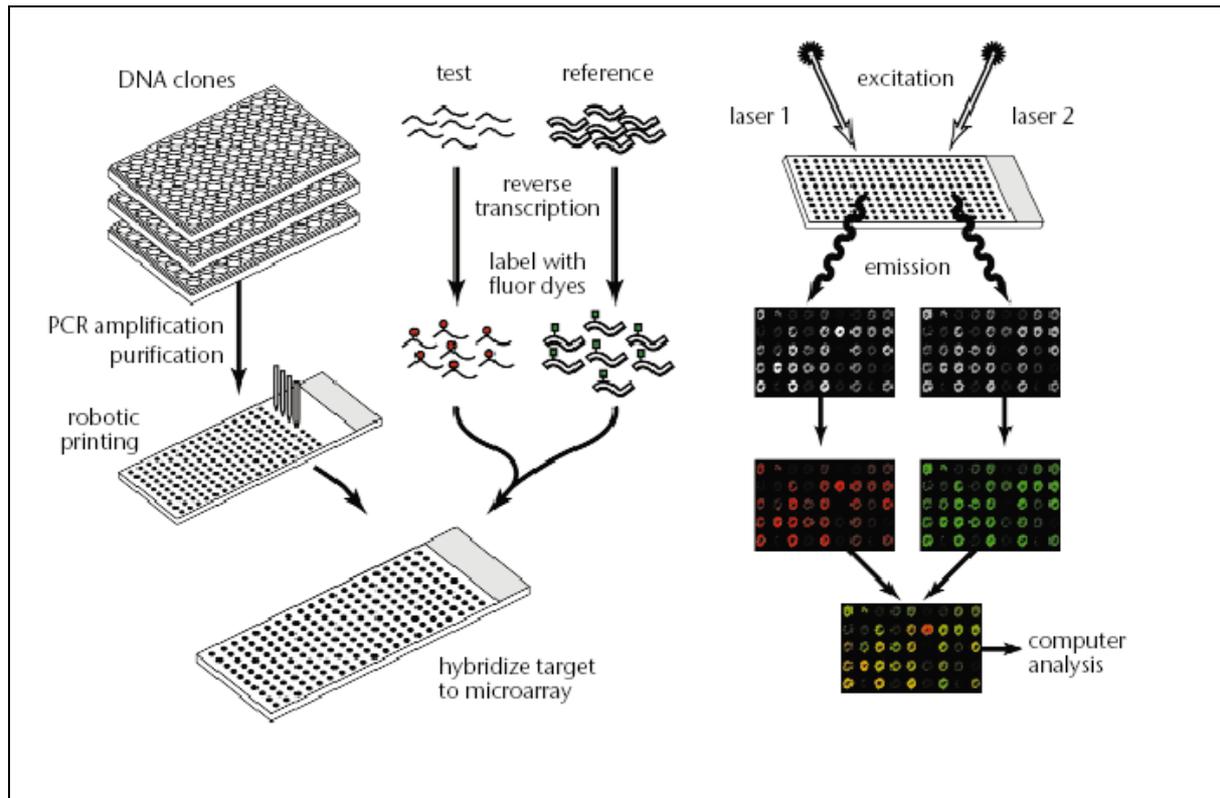


Abb.2-4 Das Microarray-Experiment,

Verlauf beim Einsatz von zwei Farbstoffen zum

Vergleich zweier RNA-Grundmengen [9902] –

Mit freundlicher Genehmigung von npg

Die markierte DNA wird auf den Array gebracht. Durch die Spezifität der Basenpaarung von Nukleinsäuren binden die markierten cDNA-Moleküle mit der auf dem Array immobilisierten Zielsequenz (Hybridisierung). Die Spezifität der Hybridisierung zwischen den komplementären Nukleinsäuren wird durch die temperaturabhängige Dissoziation des Hybridkomplexes bestimmt. Da die Hybridisierung demnach reversibel verläuft, kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen der Assoziation der einzelsträngigen *target*-DNA in der Lösung und der auf dem Spot immobilisierten *probe*-DNA und der Dissoziation des Hybrids [9903]. Folglich ist die Menge der an die immobilisierte Sonde gebundenen *target*-Moleküle abhängig von der Menge der immobilisierten Sonde zum einen und von der Menge der markierten cDNA in Lösung zum anderen. Die Hybridisierung wird durch Abwaschen der nicht gebundenen cDNA-Reste beendet und die gebundene DNA fixiert.

Die Menge der gebundenen markierten cDNA wird mit Hilfe eines Laserscanners oder einer CCD-Kamera als Hybridisierungssignal festgehalten. Bei Microarrays, die mit zwei Proben mit unterschiedlichem Fluoreszenzfarbstoff hybridisiert wurden, wird für jeden Farbstoff ein eigenes Laserbild bei der entsprechenden Wellenlänge abgespeichert. Später können diese

Bilder mit Falschfarben versehen übereinander gelegt werden und damit die Ergebnisse grob visualisiert werden. Für Cy5-Signale (*cy*, aus dem Englischen für Farbstoff, wobei die Zahl die Farbe beschreibt) verwendet man dabei meist Rot, für Cy3-Signale Grün. Legt man die beiden Bilder übereinander, so kommt es je nach Intensität der einzelnen Spots zu Mischfarben. Gelbe Spots weisen auf wenig Unterschied der Transkripte in Probe und Referenz hin, deutlich rote oder grüne Spots entsprechend auf differenzielle Genexpression. Allerdings ist die Auswertung per Auge allenfalls sinnvoll, um Hybridisierungsfehler oder ähnliches auszuschließen – ein Ergebnis liefert sie nicht. Die eigentliche Auswertung erfolgt mit speziellen Softwares für jedes Laserbild einzeln. Für jeden Spot erhält man in der Auswertung einen bestimmten Intensitätswert, welcher in seiner numerischen Größe die relative Menge an markierter cDNA widerspiegelt. Die beiden Intensitätswerte für jeden Spot kann man dann im Verhältnis zueinander betrachten und so semiquantitative Aussagen über die Unterschiede der Genexpression von Probe und Referenz machen. Unter Microarrayanwendern spricht man von **Regulation**, wenn der Vergleich der Intensitäten Differenzen oder Verhältnisse liefert, die auf eine unterschiedliche Genexpression des Gens in beiden Proben hinweist. Im Folgenden werden Gene, die in den Proben unterschiedlich exprimiert werden, als **Regulierte Gene** bezeichnet.

Die Anwendung der Microarray-Technologie kann je nach Fragestellung variiert werden. Grundsätzlich muss der Anwender sich schon bei der Versuchsplanung entscheiden, welchen Zweck die Messung verfolgt. Zum einen bietet die Methode sich als einfache, schnelle und umfassende Screeningmethode an, zum anderen ist bei genauem und statistisch korrektem Arbeiten auch eine quantitative Auswertung möglich. Einfach durchgeführte Hybridisierungen mit wenigen Wiederholungen liefern Fingerzeige, umfangreiche Messungen genaue Ergebnisse.

Vom Versuchsdesign abhängig ist auch die Datenbearbeitung und –auswertung. Wenn wir beim Beispiel des zweifarbig hybridisierten Microarrays bleiben, so muss man hier nicht nur die „inneren“ Fehler in einem Datenset betrachten, sondern auch die „äußeren“ Fehler im Bezug der beiden Datensets aufeinander. Bereits innerhalb eines Datensets können sowohl zufällige als auch systematische Fehler auftreten. Ein Beispiel für einen zufälligen Fehler wären Verschmutzungen oder eingetrocknete Puffertropfen auf der Slide-Oberfläche, die zu erhöhten Intensitätswerten führen können. Diese Probleme können häufig durch visuelle Kontrolle des Arrays erkannt und anschließend durch entsprechende Datentransformation und Filterung behoben werden. Systematische Fehler können z.B. durch die falsche Wahl des Transkriptionsprimers entstehen. Benutzt man z.B. nur einen oligo-dT-Primer, der am poly-

A-Ende der mRNA bindet und hat als Sonden aber z.T. Gensequenzen ausgewählt, die sehr nah am 5'-Ende liegen, so werden diese Gene verhältnismäßig weniger Signal erzeugen.

Noch problematischer wird der Vergleich zweier Datenmengen. Theoretisch sollten beim Einsatz der gleichen totalRNA-Menge gleiche Intensitätswerte für beide Fluorophore auftreten. Praktisch ist das aber niemals der Fall. Die Hauptursachen dafür liegen bei Messfehlern bei der totalRNA-Quantifizierung, im Charakter der Farbstoffe, beim Laser und bei der Einbauhäufigkeit der Farbstoff-verlinkten Nukleotide beim Umschreiben der mRNA in cDNA. Um die Fehlerwahrscheinlichkeit zu senken und die richtigen Ergebnisse herauszufiltern ist eine umfangreiche Bearbeitung der Laserdaten notwendig.

Dieser sehr wichtige Punkt bei der Anwendung der Microarray-Technologie wird im Kapitel Datentransformation und Auswertung ausführlich dargestellt.

2.3 Zusammenfassung der Grundlagen und Aufgabenstellung

Die Familie der Kaliumkanäle stellt die größte Ionenkanalfamilie dar und umfasst beim Säuger (Maus, Ratte und Mensch) derzeit ca. 100 bekannte Kaliumkanalunterheiten oder funktionsverwandte Proteine, sowie Hilfsproteine. Die Ionenkanalfamilie lässt sich grob in vier Gruppen unterteilen: die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V), die calcium- und spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_{Ca}), die einwärtsgleich-richtenden Kaliumkanäle (K_{ir}) und die Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle (K_{2p}). Diese Gruppen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Aufbaus und der Funktion. Auch innerhalb der Gruppen besteht große Variabilität.

Die Microarray-Technologie ist mit ca. 10 Jahren eine noch sehr junge Technologie, die man als Weiterentwicklung der Blotting-Methode betrachten kann. Sie beruht auf Hybridisierungsvorgängen von Sonde und Probe, wobei einer der beiden Partner farbig markiert ist. Entsprechend angelegte Microarray-Versuche lassen eine semiquantitative Auswertung zu, die Angaben relativer Expressionsunterschiede einzelner Gene ermöglicht. Mit einem einzelnen Experiment ist es möglich, über 10.000 Gene hinsichtlich ihres Expressionsstatus zu untersuchen. Um die Microarraymethode in der Praxis sinnvoll anwenden zu können, sind vor allem zwei Dinge entscheidend: Kenntnisse über die zu untersuchenden Gene und Proteine – in diesem Fall die Familie der Kaliumkanäle – und zum anderen das Wissen um Einsatzform und Möglichkeiten einer noch sehr jungen, innovativen Technologie.

Mit Hilfe dieser Vorkenntnisse wurde wie im Folgenden beschrieben eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, alle derzeit bekannten Kaliumkanäle mit wenig Aufwand auf

ihren Expressionsstatus zu untersuchen und die Ergebnisse mehrere Proben in Relation zu setzen. Das Hauptaugenmerk der Microarrayuntersuchungen der vorliegenden Arbeit liegt auf den beiden Familien: Kir und K2P.

Ziel meiner Arbeit war die Erstellung eines „Kaliumkanal-Chips“, die Entwicklung einer geeigneten Messmethode und Auswertungsstrategie, die Durchführung von Testmessungen und die Untersuchung eines Knockout-Mausstammes auf den Genexpressionsstatus und die auftretenden Kompensationsmechanismen.

3 Material und Methoden

3.1 Entwicklung des Microarrays / Versuchsplanung

3.1.1 Microarray-Design

Ziel der Etablierung der Microarray-Technologie war es, schnell und ohne enormen Aufwand alle Kaliumkanal-Gene in einem bestimmten Mausstamm auf ihren Expressionsstatus prüfen zu können. Eingesetzt werden sollte die Methode zum Vergleich von Knockout-Mausstämmen mit ihren Wildtypen und zur Untersuchung von Gewebeteilen und altersbezogenen Expressionsmustern. Folglich sollten die Gene aller Protein-Untereinheiten, die der Kaliumkanal-Familie zuzuordnen sind, auf dem Microarray vertreten sein. Die von uns geplante Sondenanzahl umfasste alle derzeit bekannten Kaliumkanal-assoziierten Gene (α - und β -Untereinheiten), was ca. 90 Ziel-Sonden entspricht.

Eine der wichtigsten Fragen zu Beginn war, welche Array-Methode eingesetzt werden sollte. Wie in den Grundlagen erwähnt, muss man zwei Anwendungsziele unterscheiden: das möglichst breite Screening oder die gezielte Messung mit der Option zur Quantifizierung. Arrays mit kurzen bis mittellangen DNA-Sonden (Affymetrix und Oligomer-Arrays) bieten eine größere Mismatch-Toleranz und umfangreichere Datenmenge. cDNA-Microarrays bieten im Gegensatz dazu eine größere Genauigkeit bei übersichtlicher Spotanzahl. Der Vorteil dieser Methode liegt in der bei geeigneten Hybridisierungsbedingungen sehr hohen Spezifität. Dieser Punkt war entscheidend, weil mit Hilfe der Microarray-Technologie Gene aus einer Gen-Familie untersucht werden sollten und damit mit einer hohen Ähnlichkeit einiger Sonden untereinander zu rechnen war. Beim Einsatz von Zielsonden mit ca. 500 Basenpaaren bei zugleich sehr stringenten Hybridisierungsbedingungen kann die Gefahr von Kreuzhybridisierungen minimiert werden. Unter Kreuzhybridisierung versteht man das Binden von ähnlichen Sequenzen an eine Sonde. Häufig stimmen gewisse Bereiche eng verwandter Gene überein, während vor allem im 3'-Bereich Unterschiede vorliegen. Davon zu unterscheiden sind unspezifische Bindungen, die meist durch zufällig ähnliche und kurze DNA-Sequenzen hervorgerufen werden. Aufgrund der Eigenschaften und der Ähnlichkeit der zu untersuchenden Gene der Kaliumkanäle fiel die Entscheidung auf die cDNA-Methode.

Die cDNA-Methode hat noch weitere Vorteile. Bei Oligonukleotid-Arrays hat die Sequenzzusammensetzung (das G/C:A/T-Verhältnis) einen sehr großen Einfluss auf den Hybridisierungserfolg. Umso länger die Sondensequenz, desto gleichmäßiger ist das Verhältnis und desto genauer kann man eine geeignete Hybridisierungstemperatur auswählen,

bei der an möglichst vielen Sonden eine umfassende DNA-Doppelstrang-Bildung stattfindet. [9903] Weiterhin darf man auch die Gefahr von Mutationen während der PCR zur Herstellung der Sonden-DNA nicht vernachlässigen. Bei Oligomeren können wenige falsche Basen im mittleren Bereich der Sequenz zu einer weitreichenden Instabilisierung der Doppelhelix führen und so die Hybridisierung der markierten cDNA stören. Auch hier ist eine längere Sondensequenz von Vorteil. Der einzige denkbare Nachteil der langen Sonden-DNA-Sequenzen könnten Kreuzhybridisierungen mit kurzen cDNA-Stücken sein, die aufgrund leicht degradierter mRNA oder durch Abbruchreaktionen während des Umschreibens der mRNA in cDNA entstanden sind. Dieses Problem kann man umgehen, indem man die Hybridisierungsbedingungen entsprechend stringent wählt und bei der Probenvorbereitung einen Aufbereitungsschritt einbaut, bei dem kurze cDNA-Stücke entfernt werden.

Nach der Festlegung auf einen cDNA-Microarray erfolgte die Auswahl der internen und externen Standards, sowie die Planung des Spotbildes:

Für die Auswertung und im Zuge der Datenbearbeitung, z.B. Normalisierung, ist es von Bedeutung, dass eine große Datenmenge zur Verfügung steht, die sicher „unreguliert“ ist. Die Erfahrung hat gezeigt, dass mindestens 30% der Spots durch Kontrollen (Housekeeping Gene als interne Standards und Kontroll-Gene als externe Standards) abgedeckt sein sollten [0201, 9901, 0301, 0104, 0105]. Mit Hilfe dieser Spots können bestimmte Datentransformationen durchgeführt werden, für die Intensitäten im ausgeglichenen Verhältnis als Bezugswerte herangezogen werden müssen. Auch bei Datentransformationen, die nicht auf Spots mit ausgeglichener Intensität angewiesen sind, können diese Werte eine wichtige Basis und Bezugsgröße für die Stabilität der Intensitätswerte während der Normalisierung darstellen.

Unter „internem Standard“ versteht man eine Kontrolle, die aus dem Versuchspool stammt, während ein externer Standard während der Probenvorbereitung zugesetzt wird und dann einige Schritte der Probenaufarbeitung sowie die Messung im gleichen Maße durchläuft wie die Proben. Als externe Standards kommen bei Microarray-Experimenten vor allem käuflich zu erwerbende RNAs zum Einsatz, da diese in definierter Menge zugegeben werden können und von gleich bleibender Qualität sind. Interne Standards sind im Falle des Microarrays RNAs, die immer im Pool der totalRNA enthalten sind, wie zum Beispiel die Housekeeping Gene [0501].

Als Housekeeping Gene bezeichnet man Gene, die zu jeder Zeit in fast jeder Zelle des Organismus exprimiert werden [0501], beispielsweise GAPDH. Will man die Housekeeping Gene als internen Standard einsetzen, so muss man grundsätzlich davon ausgehen, dass bei ihnen keine Regulation stattfindet. Auch hier hat die Erfahrung gezeigt, dass dies nicht immer

zutrifft. Bei jeder Methodenentwicklung muss deshalb eine entsprechende Abschätzung zur fehlenden Regulation bei den Housekeeping Genen gemacht werden. Wie in Kapitel 3.3.2. beschrieben, hat sich in unserem Fall in Messungen zeigen lassen, dass die Intensitätswerte der Housekeeping Gene jede Veränderung (Unterschiedliche Mausstämmen, Alter der Tiere) anzeigen. Dennoch bildet die Masse an Intensitätswerten eine wichtige Basis bei der Datentransformation, da sie aufgrund ihrer vergleichsweise hohen und gut reproduzierbaren Intensitäten während der Datenverarbeitung, vor allem der Normalisierung eine stabilisierende Wirkung auf den Datensatz haben.

In Tab.3-1 sind die eingesetzten Housekeeper aufgeführt. Sie sind also in der totalRNA von Proben- und Referenzorganismus enthalten und bieten sich daher auch als interner Standard an.

| Housekeeper | Genbezeichnung | Funktion im Organismus |
|-------------|---|-----------------------------------|
| ActB | β -Aktin | Strukturprotein im Zytoskelett |
| B2m | β -2-Microglobulin | Immunantwort, Antigenpräsentation |
| G6pd2 | Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-2 | Glucose-Stoffwechsel |
| Gapd | Glycerinaldehyd-phosphat-dehydrogenase | Enzym der Glycolyse |
| Gus | β -Glucuronidase | Enzym des Darm-Stoffwechsels |
| Hprt | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase | DNA-Stoffwechsel |
| Ppia | Peptidylprolylisomerase A (Cyclophilin A) | T-Zell-Protein |
| Tfrc | Transferrin-Rezeptor C | Eisentransport |
| Tuba | α -Tubulin | Baustein der Mikrotubuli |

Tab. 3-1 Auswahl der Housekeeping Gene
unter Angabe der genauen Gen-Bezeichnung
und -Funktion

Theoretisch sollten die Housekeeper bei zwei Tieren deshalb in gleicher Menge auftreten. Praktisch ist das jedoch nicht immer der Fall, da die Tiere sich in völlig gleichem Zustand befinden müssten. Faktoren wie Alter, Entwicklungsstand, Fütterung, Mausstamm und Infektionen können den Housekeeper-Status extrem beeinflussen. Deshalb können die

3.1 Entwicklung des Microarrays / Versuchsplanung

Housekeeper nur dann ohne Gefahr der Datenverfälschung zur Datentransformation herangezogen werden, wenn diese Hauptfaktoren ausgeschlossen sind. Die Auswahl der Housekeeper erfolgte in Orientierung an die üblicherweise in der cDNA-Microarray-Technologie verwendeten Gene [0501].

Ein Teil der Housekeeping Gene ist aufgrund der Funktion des Proteins in dem von uns hauptsächlich untersuchten Gewebe, dem Gehirn, nur in geringem Maße zu erwarten.

Auch diese Tatsache bestätigt sich in den Messwerten des Microarrays und fungiert so als weitere Kontrolle. Zu diesen Housekeeping Genen gehören Gus, B2m und Tfrc. Andere Housekeeper dagegen werden im Gehirn stark exprimiert und bieten sich aufgrund ihrer hohen und gleichmäßigen Intensitätswerte als Bezugswerte für die Datentransformation an. Hauptsächlich sind das ActB, Gapd, Ppia und Tuba. Hprt und G6pd2 sind schwach vertreten.

Zusätzlich zu den Housekeepern kann man verschiedenste Kontrollen als externe Standards einsetzen. Diese sollten von Organismen stammen, die mit Mäusen möglichst gering verwandt sind, um Kreuzhybridisierungen ausschließen zu können.

Die von uns eingesetzten Kontrollen sind in Tab.3-2 aufgeführt. Die RNA wird der totalRNA vor der Reversen Transkription in cDNA in definierter Menge zugesetzt – weshalb ihre Anwendung auch als „*spike-in*“ bezeichnet wird [0301, 0104]. Damit ist es möglich einen Standard für Verhältnisse zu schaffen, anhand dessen man nach der Auswertung die Quantifizierung der Transkripte überprüfen kann. Wird z.B. eine der Kontroll-RNAs im Verhältnis 1:2 eingesetzt, so sollte sich das im Ergebnis widerspiegeln.

| Gen | Ursprungsart |
|---------------------------------------|--|
| Luciferase | Lampyris noctiluca - Glühwürmchen |
| GFP „green fluorescent protein“ | Aequorea victoria nordpazifische Tiefseequalle |
| CHS1 | Saccharomyces cerevisiae |
| GAS1 | Saccharomyces cerevisiae |
| FKS1 | Saccharomyces cerevisiae |
| CHS2 | Saccharomyces cerevisiae |

Tab. 3-2 Auswahl der internen Standards
unter Angabe der Gene und Ursprungsart

Die Luciferase ist ein Enzym, das beim Glühwürmchen am Prozess der Leuchtfarbenentstehung beteiligt ist. Der Vorteil der Luciferase ist, dass die RNA in der Molekularbiologie sehr häufig als Kontrolle eingesetzt wird und sie deshalb in definierter Menge käuflich zu erwerben ist. Die vier Saccharomyces-Gene wurden ebenfalls aufgrund ihrer geringen Ähnlichkeit zu Säuger-Genen ausgewählt. Zusätzlich wurde noch GFP als

Kontrolle ausgewählt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Gen, das für die Bildung eines Leuchtfarbstoffes verantwortlich ist. Mit Hilfe dieser Standards kann die Bearbeitung der Daten entsprechend angepasst werden (vgl. Kapitel 3.3).

Die Auswahl dieser Kontroll-Gene erfolgte in Zusammenarbeit mit den erfahrenen Microarray-Benutzern vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg. Da der von mir geplante Microarray in der ersten Charge auch in diesem Institut gespottet wurde, waren die Mitarbeiter an der Entwicklung beteiligt und fungierten in beratender Funktion. Sie stellten das Sondenmaterial für die Luciferase und die Saccharomyces-Gene zur Verfügung. Bei der Planung des Microarrays ist außerdem zu beachten, dass jede Zielsonden-DNA mehrmals gespottet wird, um bei Verunreinigen auf dem Array Ausreißer streichen zu können. Die Entscheidung fiel auf jeweils 5 Replikate, um mit $n=5$ Mittelwert und Standardabweichung berechnen zu können. Bei den Housekeeping und Kontrollen wurde ein Vielfaches von den 5 Replikaten gespottet, so dass ein Gesamtanteil von ca. 30% erreicht wurde. Zusätzlich wurden einige Spots nur mit Printpuffer (Lösung, in der die DNA für den Spottingvorgang gelöst wird) gespottet, um die Spot-Intensitäten mit diesen „Blindproben“ vergleichen zu können.

Insgesamt wurden im ersten Microarrayspotbild 1200 Spots aufgetragen. Davon entfielen 360 Spots auf interne Standards (Housekeeping Gene), 175 auf externe Standards und 440 auf Sonden.

3.1.2 Auswahl der DNA-Sequenzen

Der wohl wichtigste Schritt bei der Etablierung eines Microarrays ist die Auswahl der als Sonden geeigneten DNA-Sequenzen – im weiteren Verlauf auch als Chipsequenzen bezeichnet.

Bei cDNA-Microarrays werden gewöhnlich PCR-Produkte mit 300-2000 Basenpaar-Längen eingesetzt [9902]. Grundsätzlich kommen aber nur Sequenzen mit ähnlichen Längen zum Einsatz, weil dann für alle Sonden ähnliche Hybridisierungsbedingungen gelten. Die Einhaltung eines maximalen Sequenzlängenunterschiedes von 50-100 Basenpaaren ist deshalb Voraussetzung bei der Auswahl der Sonden [0106].

Am Beginn der Auswahl steht die Entscheidung zur Länge der Zielsonden. Verschiedene Faktoren, wie Spezifität, Gefahr der Kreuzhybridisierungen und Verfügbarkeit der Chipsequenzen müssen dabei bedacht werden. Die Zusammenhänge dieser Faktoren sind in Abb. 3-1 dargestellt.

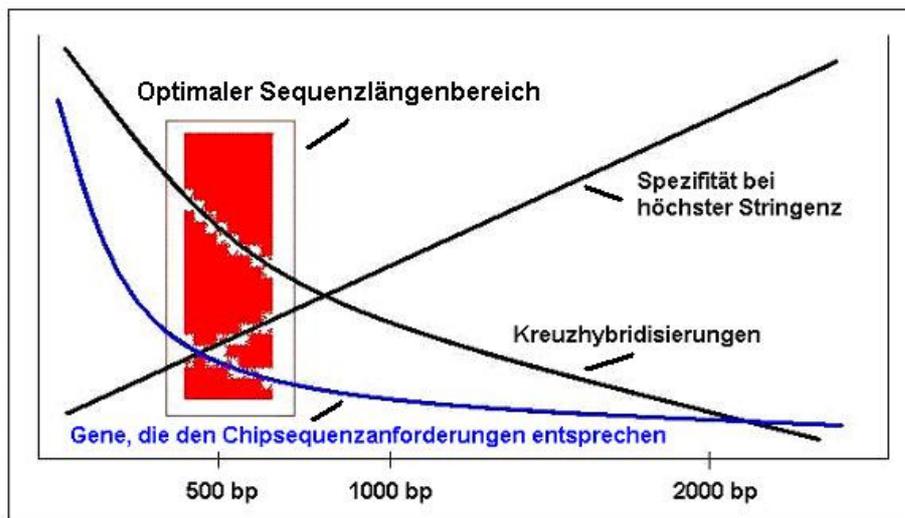


Abb. 3-1 Schematische Darstellung der Einflussfaktoren bei der Auswahl der Zielsequenzen

Beginnen wir mit der Spezifität. Geht man davon aus, dass entsprechend der steigenden Länge der Sonden auch die Hybridisierungsbedingungen immer stringenter gewählt werden, dann bedeutet das, dass mit der Sondenlänge die Spezifität zunimmt. Voraussetzung dafür ist neben geeigneten Hybridisierungsbedingungen auch die zuverlässige Abtrennung von RNA-Resten, kurzen cDNA-Sequenzen und DNA-Bruchstücken. Erfüllt man die Faktoren, so nimmt nicht nur die Spezifität deutlich zu, sondern es sinkt auch die Gefahr von Kreuzhybridisierungen. Wie zuvor beschrieben, werden die aus Sondenstrang und markiertem cDNA-Strang gebildeten Doppelstränge mit ihrer Länge immer stabiler und bilden sogar Wechselwirkungen aus, die zur parallelen Anordnung führen und so zusätzlich stabilisierend wirken. Von dieser Seite aus betrachtet, wäre es also sinnvoll, möglichst lange Sonden einzusetzen. Der begrenzende Faktor ist aber die Verfügbarkeit der Chipsequenzen. Umso länger die gewünschte Chipsequenz ist, desto geringer ist die Anzahl der Gene, die in ihrer Primärsequenz einen Bereich enthalten, der als Chipsequenz eingesetzt werden kann. Einfach ausgedrückt ist es leichter eine 300-Basenpaar-Sequenz zu finden, die geeignet ist, als eine 2000-Basenpaar-Sequenz. Geeignete Sequenzen zeichnen sich durch ihre Einzigartigkeit aus, die eine hohe Spezifität der Hybridisierung garantiert. So kann die Chipsequenz z.B. nicht in den hochkonservierten Poren-Bereich eines Ionenkanals gelegt werden, da hier Kreuzhybridisierungen mit anderen nah verwandten Sequenzen auftreten würden. Einige der für den „Kaliumkanal-Microarray“ vorgesehenen Gene weisen auch nur 100-150 Aminosäuren im Protein auf, also um die 300-450 Basenpaare. Diese Gene und die nahe

3.1 Entwicklung des Microarrays / Versuchsplanung

Verwandtschaft der Kaliumkanäle begrenzte die Sondenlänge auf dem „Kaliumkanal-Microarray“ auf 300-500 Basenpaare.

Die entscheidenden Punkte bei der Auswahl der Chipsequenzen kann folgendes Beispiel der Kaliumkanal-Unterfamilie KCND verdeutlichen. Es handelt sich um spannungsabhängige Kaliumkanäle, die hauptsächlich in Gehirn und Herz, aber auch anderen Geweben, exprimiert werden. Die Unterfamilie hat nur drei Mitglieder, weshalb sie als übersichtliches Beispiel geeignet ist. Abb. 3-2 zeigt ein Alignment (Sequenzvergleich mehrerer Basen- oder Proteinsequenzen mit Hilfe spezieller Software – hier MegAlign von LaserGene) der Proteinsequenzen aller drei Kanäle.

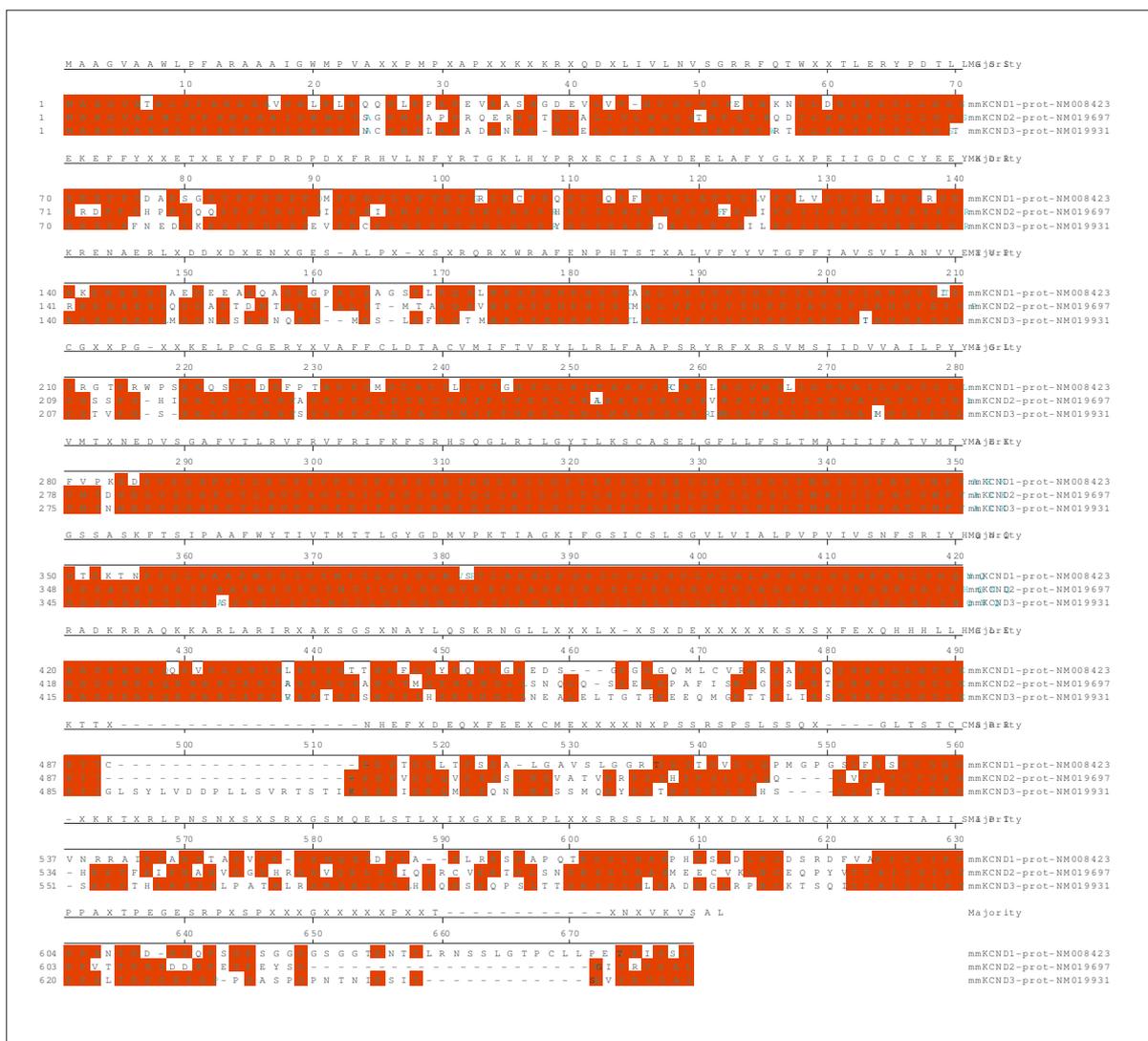


Abb. 3-2 Alignment nach Clustal V der Proteinsequenzen der drei kcnd-Kaliumkanal-Gene.

Ungefähr im Bereich von 170 Aminosäuren beginnt ein Abschnitt mit hoher Ähnlichkeit; ca. zwischen Aminosäure 290 und 430 liegt der hochkonservierte Bereich, der u.a. für die Poresequenz codiert. Im Anschluss daran folgt ein Bereich mit geringer Ähnlichkeit, der

allerdings bei KCND1 und KCND2 recht kurz ausfällt. Die Auswahl der Chipsequenz kann in diesem Beispiel also nur in den vordersten Bereich fallen oder ans Ende der Sequenz.

Grundsätzlich ist eine Sequenz am Ende der kodierenden Region (*open-reading-frame*), bzw. im 3'-Bereich der mRNA zu bevorzugen, weil beim Umschreiben der mRNA in cDNA mit oligo-dT-Primern gearbeitet wird, die am poly-A-Ende der mRNA binden. Von diesen Primern aus synthetisiert die Transkriptase unter Einbau der Farbstoff-gekoppelten Nukleotide die cDNA. Dabei kommt es im Verlauf des Umschreibens zu Kettenabbrüchen, was aufgrund der großen Farbstoffmoleküle häufiger passiert als bei normalen Transkriptionen.

So wird bei einem großen Teil der Transkriptionen das 5'-Ende nicht erreicht. Daher legt man die Chipsequenz bevorzugt in den häufiger transkribierten Bereich. Bei vielen Kaliumkanal-Genen ist die Sequenz aber noch nicht abschließend geklärt und deshalb die Sequenzinformation gerade im 3'-Bereich lücken- oder fehlerhaft. Deshalb war in vielen Fällen ein Ausweichen in den 5'-Bereich des kodierenden Bereiches nötig. Außerdem kann das zuvor beschriebene Problem mit den oligo-dT-Primern durch den Einsatz von Nona-Random-Primern weitestgehend umgangen werden. Diese Primer mit neun in jeder denkbaren Möglichkeit kombinierten Basenpaaren binden auch im mittleren und vorderen Bereich der mRNA (5'-Bereich), führen so zum Übersetzen der mRNA in cDNA auf der gesamten Sequenzlänge und sichern damit die Erfassung der Sequenzen in diesem Abschnitt. Wahrscheinlich hybridisieren an Sonden, deren Sequenz aus dem 5'-Bereich der mRNA-Sequenz stammt, insgesamt etwas weniger mit Farbstoff markierte cDNA-Stränge, aber für die Messung ist das ausreichend.

Außerdem sind beide Farbstoffe (vgl. Kapitel 2, Cy3 und Cy5) davon betroffen, so dass die relativen Unterschiede der Intensitäten nicht beeinflusst werden.

Die Chipsequenzen wurden außerdem so gewählt, dass die Ähnlichkeit beider Sonden unter 75% lag; dann ist nicht mit Kreuzhybridisierungen zu rechnen [9903]. Abb. 3-3 zeigt die Chipsequenz von KCND1.

| | |
|----------------------------------|-----|
| CCAGCAGCCCCTACCCCTGCACCGGAGGT | 30 |
| GAAGGCATCCCGAGGGGA TGAGGTTCCTGGT | 60 |
| CGTGAAATGTGAGTGGTCCGGCGCTTTGAGAC | 90 |
| CTGGAAA AACACACTGGATCGCTACCCAGA | 120 |
| CACATTGCTGGGCAGCTCGGA GAAGGAA TT | 150 |
| CTTCTATGATGCTGAA TCTGCCGAG TACTT | 180 |
| CTTTGATCGTGACCCAGA CATGTTCCGGCA | 210 |
| CGTGCTGAACTTTTATCGCACTGGCCGGCT | 240 |
| GCACTGCCCCAGG CAGGAG TGCATCCAGGC | 270 |
| CTTTGATGAGGAG CTGGCCTTCTATGGCTT | 300 |
| GGTCCCAGAGCTGGTTGGTGA CTGCTGTCT | 330 |
| TGAAGAG TACAGGGACC GTAAG AAGGAAA | 360 |
| CGCAGAGCGCCTGGCAGAAGA TGAGGAG C | 390 |
| TGACGAG GCCGGGG AAGGTCCAGCCCTTCC | 420 |
| AGCAGCCAG CTCCCTGCCA | 439 |

Abb. 3-3 Auswahl der Primer-Sequenzen
am Beispiel des kcnd1-Kaliumkanal-Gens.

3.1 Entwicklung des Microarrays / Versuchsplanung

Sie wurde entsprechend den oben beschriebenen Anforderungen ausgewählt. Die farbige unterlegten Bereiche zeigen die Primersequenzen. Die Auswahl der Primer erfolgte per Hand oder mit Hilfe der Software PrimerSelect aus dem Software-Paket Lasergene.

Dies wurde zum Abschluss der Sequenzauswahl durch ein Alignment der Chipsequenzen für jede Familie im Einzelnen und für eng verwandte Familien wie bei den K_v-Kaliumkanälen abgesichert.

Bei der Auswahl der Primer bzw. der beiden Enden der Chipsequenz werden die Anforderungen noch höher gesetzt. Hier dürfen zwischen den Sequenzen zu max. 50 Prozent Ähnlichkeiten auftreten, um während der PCR das Auftreten von Nebenbanden zu vermeiden. Die ausgewählten Chipsequenzen wurden per Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) generiert, eine bei der Herstellung der cDNA-Microarrays übliche Methode. Dabei herrscht allerdings Uneinigkeit über den Reinigungsgrad der zu spottenden DNA. Diehl et al. [0204] haben gezeigt, dass der Einsatz ungereinigter PCR-Produkte die Signalintensität nur um 6% absenkt. Gleichzeitig sinkt allerdings die Varianz in der DNA-Menge pro Spot, was zu gleichmäßigeren Intensitätsmessungen führt. In unserem Fall lieferte der größte Teil der PCRs einzelne klar abgetrennte Banden. Bei einigen PCRs traten allerdings Nebenbanden auf. Deshalb wurden alle Produkte aufgereinigt, um Salze, Enzyme und Primer-Reste zu entfernen. Jede Sequenz wurde zum Abschluss der DNA-Gewinnung über eine Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Im Folgenden möchte ich auf einige Probleme und spezielle Fragestellungen hinweisen, die beim Einsatz der Microarray-Technologie zu bedenken sind.

Leider ist es nicht so, dass die gemessene Intensität der Gene direkt einen Hinweis auf ihren Expressionsgrad gibt. Die pro Spot gemessene Intensität variiert unvermeidbar von Gen zu Gen. Dafür sind mehrere Faktoren verantwortlich, die zum Teil beim Spotten auftreten, aber auch durch die Messmethode bedingt sind. Die beim Spotten eingesetzten PCR-Produkte weisen nicht 100%ig gleiche Konzentrationen auf und können so bei gleichem Spot-Volumen-Einsatz zu unterschiedlichen DNA-Mengen führen. Zusätzlich variiert auch die pro Aufsetzen der Nadel auf die Festkörperoberfläche aufgetragene Lösungsmenge, die den einzelnen Spot darstellt. Auch nach dem Spotten beeinflussen weitere Probleme die absoluten Intensitätswerte. Wie zuvor schon beschrieben, spielt z.B. der C-Gehalt in der Sequenz eine entscheidende Rolle, weil nur CTG als Farbstoff-gekoppeltes Nukleotid eingesetzt wird und beim Messen mehr Signal hervorruft. Aufgrund all dieser Einflüsse ist auch innerhalb eines Datensatzes, also innerhalb der Daten eines Farbstoffes, nur eine semiquantitative Bewertung möglich. Lediglich die völlige Abwesenheit eines Genes lässt sich über die Intensitäten als

Wert festlegen. Gene, die eine deutlich vom Hintergrund abgehobene Intensität aufweisen, lassen sich semiquantitativ zueinander und relativ zwischen den Datensätzen miteinander vergleichen.

3.1.3 Messplanung und Versuchsdesign

Die Planung der Einzelexperimente ist einer der entscheidenden Punkte in der Microarray-Technologie. Ein gelungenes Design ist Voraussetzung für qualitativ hochwertige Daten, die den an sie gestellten Anforderungen entsprechen [0301].

Dabei beginnt auch hier wieder das Design mit der Fragestellung, die hinter dem Einsatz des Microarrays steht. Einfache Screening-Slides sind mit wenigen Experimenten abgedeckt. Komplizierte Fragestellungen mit Quantifizierung bedürfen dagegen einer umfangreichen Versuchsplanung, die auch einer umfangreichen statistischen Auswertung standhält [0105, 0301].

Ein Microarray-**Versuch** umfasst eine Vielzahl von Einzelmessungen (= **Experimente**). Umso umfangreicher die Fragestellung und die gewünschte Datenqualität, desto mehr Microarray-Experimente müssen durchgeführt werden. Dabei kommt in der Regel eine gewisse Grundmenge von **Proben-RNA** (RNA, bei der Genregulation vermutet wird, z.B. RNA eines Knockouttieres) zum Einsatz. Aus dieser Grundmenge heraus werden die Einzelexperimente geplant. Zum Vergleich wird **Referenz-RNA** (RNA, die den „Normalzustand“ darstellt und als Bezugsgröße fungiert, z.B. Wildtyp-RNA) eingesetzt.

Kontroll- Experimente

In der Versuchsvorbereitung müssen einige Kontroll-Experimente durchgeführt werden, deren Daten Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der eigentlichen Experimente sind. Dabei gibt es Tests, die die Qualität der eingesetzten Slide-Charge, also in einem Spotting-Vorgang hergestellte Gruppe an Microarrays, nachweisen und Tests, die bei den einzelnen Microarray-Versuchen durchzuführen sind [0301].

Nach dem Spotten einer Slide-Charge wird mit Hilfe farbig markierter kurzkettiger Random-cDNA die gespottete DNA auf Menge und Hybridisierungsfähigkeit getestet. Dabei müssen alle Spots eine gleichmäßige Färbung bei beiden Farbstoffen aufweisen und die Printpuffer-Spots müssen schwarz bleiben.

In einem zweiten Experiment werden in Form von Kontroll-RNA alle externen Standards eingesetzt und ihre Hybridisierung kontrolliert. Dabei sollten die eingesetzten Mengen nach der Auswertung quantitativ nachvollziehbar sein und was noch wichtiger ist, es sollten keine

Hybridisierungen im Bereich der eigentlichen Zielsonden auftreten, um Kreuzhybridisierungen durch Kontrollen an die Zielsonden bei den weiteren Messungen ausschließen zu können.

Nach dem Nachweis der Qualität der einzusetzenden Slide-Charge wird vor der Durchführung eines Microarray-Versuches mit der Proben-RNA ein Vorversuch - die so genannte Konkordanzanalyse - durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.5). Dafür wird RNA aus einer Grundgesamtheit, z.B. vom gleichen Tier oder aus dem gleichen RNA-Pool in zwei Teile geteilt und dann mit beiden Farbstoffen markiert. Nach der Hybridisierung werden die beiden Datensets gegeneinander ausgewertet. Die Intensitäten und die relativen Verhältnisse bzw. Differenzen geben einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit und den Vertrauensbereich der Messdaten. Die durchschnittliche Varianz bei diesen Messungen und die maximale Abweichung der Intensitäten nach Entfernung der Ausreißer sind Grundlage für die darauf folgenden Messungen und die Bewertung der Ergebnisse.

Versuchsdesign

Um im Zuge der Auswertung die Intensitäten von Probe und Referenz sinnvoll in Relation setzen zu können, muss zu Beginn der Experimente das Versuchsdesign festgelegt werden. Darunter versteht man die Festlegung von Mess-Schemata, die unter Beachtung aller Anforderungen wie *Dye-Switch* (vgl. Kapitel 3.3.5), biologische Replikation usw. zur Planung der Einzelexperimente im Zuge eines Microarray-Versuches herangezogen werden können. Kerr und Churchill beschreiben mehrere Möglichkeiten des *Versuchsdesigns*, welche im Folgenden erläutert werden [0103, 0201].

Die einfachste vorstellbare Versuchsanordnung ist die direkte vergleichende Messung von Proben-RNA und Referenz-RNA, z.B. der Vergleich der RNA eines Knockout-Tieres mit der RNA seines Wildtyps. Dieses Layout bezeichnet man als Referenz-Design (siehe Abb. 3-4).

In jeder einzelnen Messung wird der Proben-Datensatz (z.B. Einzeltier oder Tierpool von Tieren mit speziellen Eigenschaften) auf den Referenzdaten-

satz (z.B. Pool von Tieren mit gleich bleibenden Eigenschaften wie Wildtyp-Stamm) bezogen.

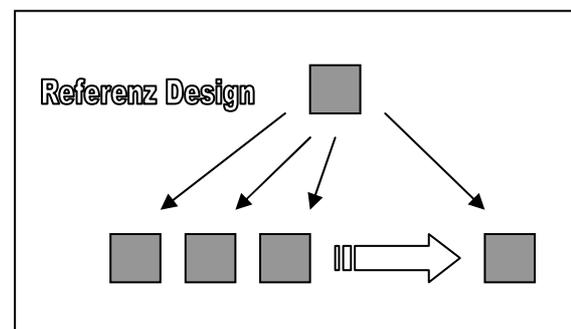


Abb. 3-4 Schema zum Design-Layout „Referenz Design“
Gestaltet in Anlehnung an Abbildungen bei [0103].

Die Auswertung liefert bei jedem Experiment ein relatives Verhältnis von Probe und Referenz zueinander. Wichtig bei diesem Versuchsdesign ist die Durchführung eines *Dye-Switch*, weshalb für jedes RNA-Paar zwei Experimente durchgeführt werden müssen (*Dye-Switch*: Farbeffekt, der zu nicht-Gen-, sondern Farbstoff-abhängigen Unterschieden in den Intensitäten führt, vgl. Kapitel 3.3.5). Wie aus der Abbildung [Abb.3-4] ersichtlich, kommt als Referenz häufig ein RNA-Pool mehrerer RNA-Grundmengen zum Einsatz, z.B. ein Pool mehrerer Wildtyp-Tiere. Vor- und Nachteile des Einsatzes von Einzeltier- bzw. Pool-RNA wird im Folgenden noch ausführlicher behandelt.

Alternativ zum Referenzdesign kann das Loop-Design bei der Versuchsplanung herangezogen werden. Beim Loop-Design werden die zu untersuchenden totalRNAs nicht in jedem Experiment direkt miteinander verglichen, sondern in einem kreisrunden Schema eingesetzt. Abb. 3-5 zeigt das Vorgehen innerhalb eines Loops.

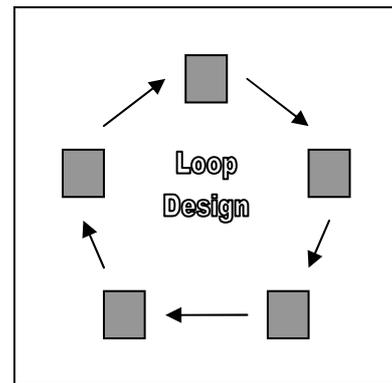


Abb. 3-5 Schema Design-Layout „Loop Design“
Gestaltet in Anlehnung an Abbildungen bei [0103].

Im Loop-Design stellt jedes Kästchen eine RNA-Grundmenge dar. Alle für die Versuche vorgesehenen RNAs werden in den Kreis aufgenommen und dabei abwechselnd nach Probe und Referenz angeordnet. So entsteht der in Abb. 3-6 dargestellte Versuchskreis, in dem sich Proben-RNA (dunkel) und Referenz-RNA (hell) abwechseln. Bei der Durchführung des Versuches wird jede RNA mit ihren direkten Nachbarn verglichen, d.h. jede RNA kommt in zwei Experimenten zum Einsatz und wird dabei mit zwei verschiedenen RNAs verglichen. Ein Experiment wird im Loop also von zwei benachbarten Kästchen bestimmt und durch den Doppelpfeil dargestellt.

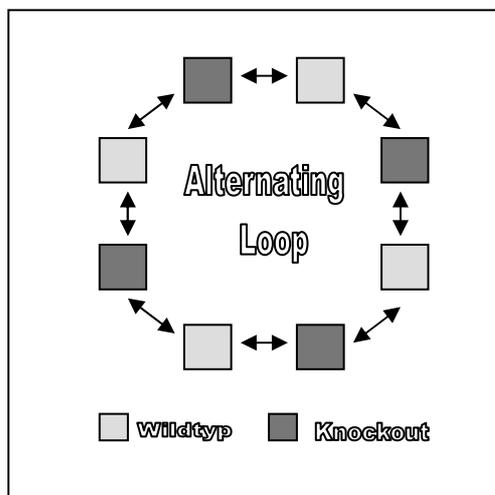


Abb. 3-6 Schema Alternating Loop-Design
Gestaltet in Anlehnung an Abbildungen bei [0103].

In der Versuchsdurchführung wird der Loop im Uhrzeigersinn umlaufen und in jedem Experiment, d.h. bei jeder Paarung, wird der jeweils erste Partner mit einem festgelegten Farbstoff, meist Cy3, markiert. Der darauf folgende Experimentpartner wird entsprechend mit dem zweiten Farbstoff markiert. Auf diese Weise kommt jede RNA-Grundmenge zweimal zum Einsatz, wobei durch die Wechsel der Farbstoffe beim Abschreiten des Loops auch die Anforderung des *Dye-Switches* erfüllt ist.

Kerr et al. haben gezeigt, dass kleine Loops die effizienteste Methode darstellen, gefolgt von der Referenzmethode und den recht ineffizienten großen Loops [0103].

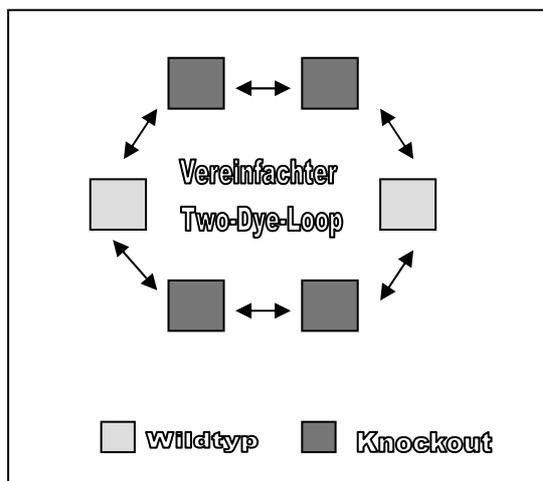


Abb. 3-7 Schema zur Darstellung des Loop-Designs beim Einsatz von zwei Farbstoffen und Vergleich Knockout – Wildtyp
Gestaltet in Anlehnung an Abbildungen bei [0103].

Bei gut validierten Versuchsanordnungen und unter Verwendung eines RNA-Pools für die Referenz kann in kleinen Loops sogar jedes zweite Referenz-Kästchen weggelassen werden (vgl. Abb. 3-7). Es ist nachvollziehbar, dass das Loop-Design eine weitaus größere Datenmenge bei Durchführung gleicher Experimentzahlen generiert als das Referenzdesign [0103].

Dafür ist allerdings die Datenauswertung weitaus komplizierter und anfälliger als beim robusten Referenzdesign. Dieses ist leichter zu planen, durchzuführen und auszuwerten, da es nicht nötig ist, die Datensätze mehrerer Experimente untereinander zu vergleichen. Beim Loop-Design müssen entsprechend der Anordnung der Einzelexperimente nicht nur die Datensätze beider Farben innerhalb eines Experimentes verglichen und angepasst werden, sondern auch noch die Datensätze aller am Loop beteiligten Slides. Mehr zum Thema der Datenbearbeitung findet sich im Kapitel Datentransformation (vgl. Kapitel 3.3).

Die Entscheidung, ob das Referenz- oder das Loopdesign oder möglicherweise auch eine Mischung aus beidem eingesetzt werden, muss für jeden Microarray-Versuch neu getroffen werden. In unserem Fall wurden beide Designmethoden eingesetzt. Vor allem beim grundsätzlichen Testen der Methode und der Generierung kleinerer Test-Datensätze ist das Referenzdesign Methode der Wahl. Im Zuge der Messungen zum Vergleich der TRESK-Knockout-Tiere mit ihrem Wildtyp kam z.B. ein Loop-Design zum Einsatz (vgl. Kapitel 4.2).

Poolen der RNA

Bei beiden Formen des Versuchsdesigns stellt sich im Verlauf der Versuchsplanung die Frage, ob die einzusetzende RNA gepoolt werden sollte oder besser nicht. Unter dem Poolen der RNA versteht man das Mischen der totalRNA mehrerer Einzeltiere zu einer gemeinsamen Grundmenge.

Der Vorteil des Poolens liegt in der Erfassung mehrerer Einzeltiere in einer Messung. Ausreißer werden abgemildert und wirken sich nicht in Einzelmessungen als scheinbares Ergebnis aus. Gene, die aus einer gepoolten Grundgesamtheit als reguliert herausstechen, sind im großen Teil der Fälle auch zuverlässig als richtig anzusehen. In wenigen Ausnahmen kann es jedoch sein, dass ein einzelner Ausreißer in der RNA-Gesamtheit die Daten eines Genes in der Messung des Pools so stark beeinflusst, dass falsch-positive Regulationen angezeigt werden. Wenn die Messungen auf die gepoolte RNA-Menge beschränkt werden und die Einzeltiere nicht zusätzlich in Einzelexperimenten getestet werden, dann werden diese Regulationen fälschlicherweise als Ergebnis übernommen. Werden dagegen nur die Einzeltiere untersucht und sollen miteinander verglichen werden, so ist eine weitaus größere Anzahl von Messungen nötig, um verlässliche Ergebnisse zu erlangen. Für Einzeltiere wird man sich vor allem dann entscheiden, wenn nur eine kleine Anzahl von Versuchstieren zur Verfügung steht. Sie werden z.B. im Loop-Design miteinander und mit der Referenz verglichen. In der Versuchsauswertung werden die transformierten Datensätze von Probe und Referenz zusammengefügt und diese resultierenden Datensätze werden im Folgenden miteinander verglichen. Ausreißer sind über Filterverfahren leicht zu eliminieren (siehe Kapitel 3.3 Datentransformation).

Für größere Datensätze bietet es sich an, sowohl mit gepoolter RNA zu arbeiten als auch stichprobenartig die Ergebnisse einzelner Tiere zu überprüfen.

Replikate

Man unterscheidet technische und biologische Replikate [0105, 0103].

Technische Replikate sind wiederholte Messungen mit einem einzigen totalRNA-Paar, also aus zwei gleich bleibenden Grundmengen, z.B. von einem Knockout-Tier oder Knockout-Pool und dem dazu gehörenden Wildtyp-Pool [0103, 0301]. Die beiden Grundmengen werden in mehreren Experimenten miteinander verglichen, wobei die Farbstoffe entsprechend den *Dye-Switch*-Anforderungen ausgetauscht werden. Die Bedeutung der technischen Replikate liegt in der Reproduktion von Messergebnissen. Sind die Messergebnisse gut reproduzierbar und erreicht man auch beim *Dye-Switch* gleichwertige Daten, kann man nicht nur von einem geringen zufälligen Fehler ausgehen, sondern auch Rückschlüsse auf den systematischen Fehler ziehen, da wie zuvor beschrieben, ein großer Teil des systematischen Fehlers auf Farbeffekte zurückzuführen ist.

Die technischen Replikate sind natürlich nicht ausreichend, um eine fundierte statistische Auswertung durchzuführen. Dafür bedarf es der Anwendung von biologischen Replikaten [0105]. Darunter versteht man die Messung mehrerer Einzeltiere oder Pools, die beim Vergleich der erhaltenen Datensets gegeneinander statistisch zu überprüfende Datenmengen liefern. Dazu werden mehrere Einzeltiere oder Pools in einem oben beschriebenen Versuchsdesign, vorzugsweise im Loop-Design, gegeneinander gemessen. Im Zuge eines Microarray-Versuches mit TRESK-Knockout-Mäusen wurde ein Loop-Design entsprechend Abb. 3-8 durchgeführt. Durch die abwechselnde Anordnung von Knockout- und Wildtyp-Proben wird jede Probe gegen zwei Proben der anderen Mausgruppe gemessen, also je eine Knockout gegen zwei Wildtypen und umgekehrt. Zusätzlich garantiert diese Versuchsanordnung auch noch den *Dye-Switch* (vgl. Kapitel 3.3.5).

Bei der Auswahl der Versuchs-RNA sollte darauf geachtet werden, dass nur der zum Knockout-Tier passende Wildtypstamm eingesetzt wird. In der Literatur finden sich immer wieder Hinweise darauf, dass einzelne Mausstämme hinsichtlich bestimmter Gene unterschiedliche Genexpression aufweisen [0105]. Genauso wichtig ist es außerdem, nur Tiere gleichen Alters einzusetzen. Zu beiden Anforderungen wurden im Laufe der Methodenentwicklung Untersuchungen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2).

3.2 Methodenentwicklung und Testmessungen

Im Zuge der Methodenentwicklung und zur Beurteilung der Datenqualität wurden mehrere Experimente als Testmessungen durchgeführt.

3.2.1 Vergleich der Wildtyp-Stämme CD1 und C57/Black6

Wie zuvor erwähnt gibt es in der Literatur viele Hinweise darauf, dass die verschiedenen im Laborbereich eingesetzten Mausstämme sich hinsichtlich der Genexpression unterscheiden. Aus diesem Grund sollten die Vergleiche von Knockout-Tieren immer im Bezug zu dem Wildtyp erfolgen, aus dem heraus sie gezüchtet wurden. Im Zuge der Testmessungen wurden deshalb mehrere Experimente durchgeführt, die dem Vergleich der beiden Mausstämme CD1 und C57/Black6 dienten. Da es sich dabei wie gesagt, um Tests handelte, konnten nur wenige der gewonnen Datensets ausgewertet werden.

Die wenigen auswertbaren Messungen haben gezeigt, dass die Mausstämme CD1 und C57/Black6 sich hinsichtlich ihrer Kaliumkanal-Expression nur gering unterscheiden. Aufgrund der geringen Experimentanzahl ist eine Quantifizierung und Angabe signifikanter Unterschiede nicht möglich.

Im Folgenden werden exemplarisch die Ergebnisse eines Experimentes vorgestellt. Als RNA kam jeweils ein Pool der totalRNA des gesamten Gehirnes mehrerer Männchen eines Stammes zum Einsatz. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme ca. 8 Wochen alt.

Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben unter Logarithmierung zur Basis 2 und unter Normalisierung innerhalb des Datensatzes nach Lowess [0402, 0203].

Die Auswertung erbrachte kaum Unterschiede bei den beiden Mausstämmen. Ein Auszug aus den als Grob-Screening anzusehenden Daten liefern die beiden Abbildungen (Abb. 3-8, Abb. 3-9), die zum einen die Regulationen bei den Housekeepern und zum anderen eine Auswahl derjenigen Kaliumkanal-Gene zeigen, die leichte Regulationen, also Unterschiede in der Genexpression (vgl. Kapitel 2.2.2) aufweisen.

Abb. 3-8 zeigt die Mittleren Differenzen der Intensitäten der Housekeeper. Keines dieser Gene lässt eine Regulation in der Genexpression erkennen. Lediglich B2m und GAPD zeigen Abweichungen über 10%. Da sie aber zugleich sehr hohe Standardabweichungen aufweisen, sind die Daten wenig zuverlässig. Gut nachvollziehen lassen sich dagegen die Expressionsmuster, die für das Gehirn zu erwarten sind.

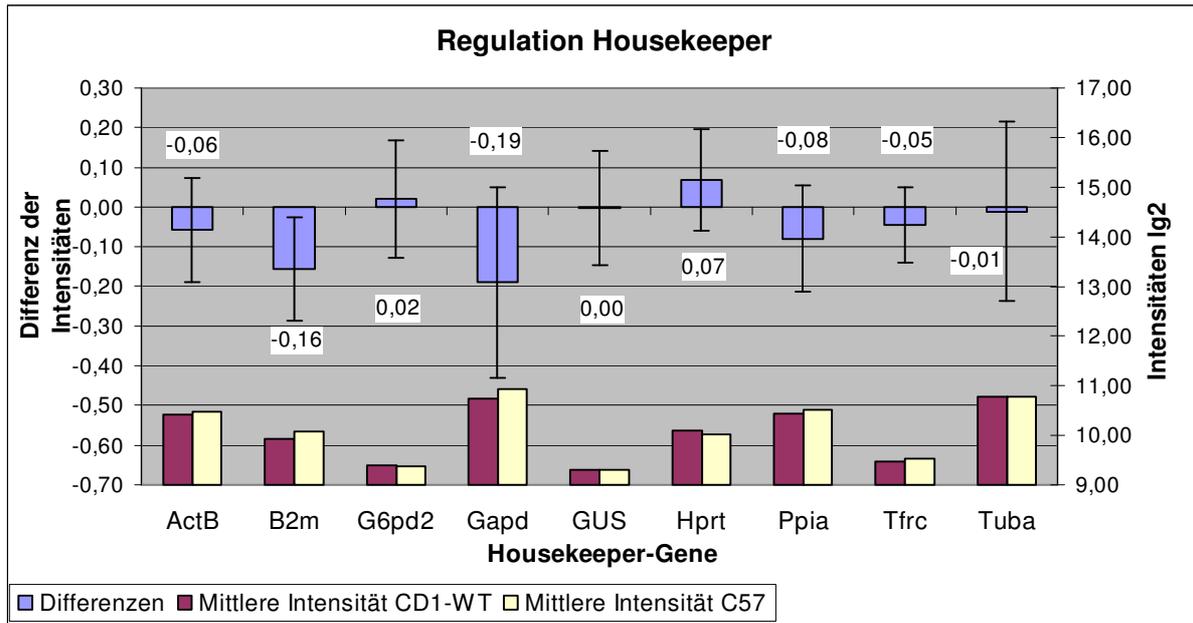


Abb. 3-8 Intensitätsunterschiede zwischen CD1-Wildtyp und C57/Black6-Wildtyp (Messdaten 230605-S10-0305, Cy3-CD1, Cy5-C57/Black6, Auswertung über ImaGene, logarithmiert zur Basis 2, normalisiert nach Lowess)

Die Gene β -Aktin, GAPD und α -Tubulin sind als im Gehirn aktiv zu erwarten und zeigen das auch durch im Verhältnis höhere Intensitäten.

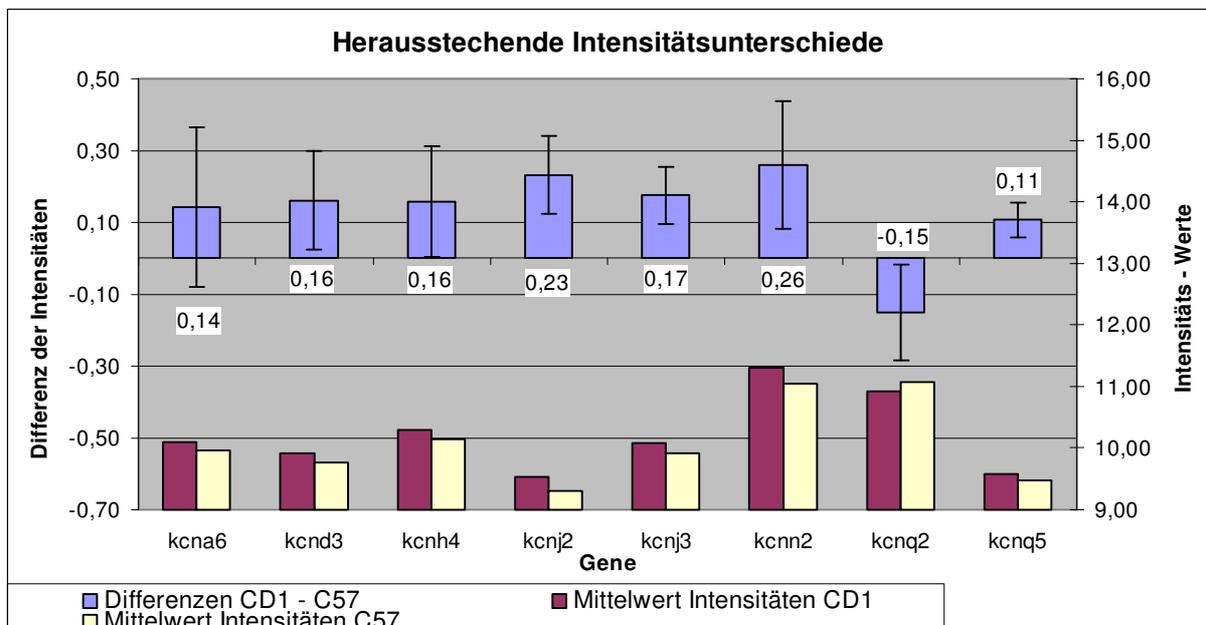


Abb. 3-9 Intensitätsunterschiede zwischen CD1-Wildtyp und C57/Black6-Wildtyp (Messdaten 230605-S10-0305, Cy3-CD1, Cy5-C57/Black6, Auswertung über ImaGene, logarithmiert zur Basis 2, normalisiert nach Lowess)

Abb. 3-9 zeigt einen Auszug aus dem Datenset der Kaliumkanal-Gene. Aus der Gesamtheit aller auf dem Chip befindlichen Gene zeigten sich lediglich diese wenigen Kandidaten als reguliert. In der Abbildung sind alle Gene aufgeführt, die eine Abweichung von mehr als 10% als Auf- oder Ab-Regulation zeigen. Besondere Aufmerksamkeit sollte man aber auch der Standardabweichung der Differenzen schenken, die sich aufgrund der 5-fach-Replikation der Zielsonden ergibt. Der Mittelwert aller Differenzen der Kalium-Kanal-Gene liegt bei 0,02 mit einer Standardabweichung von 0,11. Differenzen mit Standardabweichungen, die den Mittelwert überschreiten sind entsprechend stärker zu bezweifeln als Werte mit sehr kleinen Standardabweichungen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese beiden Mausstämme sich nach unseren Messungen nicht nachweisbar unterscheiden. Dennoch ist es empfehlenswert, den zum Knockout-Stamm passenden Wildtyp-Stamm einzusetzen.

3.2.2 Vergleich Gehirnabschnitte und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1

Im Zuge der Methodenentwicklung wurden die Gehirnabschnitte einiger männlicher Tiere des CD1-Mausstammes mit dem Gesamtgehirn verglichen. Die Präparation erfolgte unter makroskopischer Einschätzung der Strukturen und ist daher nicht sehr präzise. Dennoch lassen sich eindeutige Unterschiede erkennen. Da nur wenige Daten zur Verteilung der Kaliumkanäle bei der Maus zu Verfügung stehen [0108], wurde teilweise auch ein Vergleich mit der humanen Verteilung durchgeführt [0107].

Vergleich Cortex und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1

Es wurden zwei Experimente zum Vergleich der beiden RNA-Pools durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte ohne Background-Korrektur nach Logarithmierung zur Basis 2 und Normalisierung nach Lowess. Die Überprüfung der Kontrollen zeigte eine gute Datensatz-Qualität.

Die beiden Datensätze wurden nach der Einzelauswertung aufeinander normalisiert, indem die Mittelwerte der beiden kompletten Datensätze miteinander verglichen und dann durch Subtraktion oder Addition aufeinander angeglichen wurden.

Abb. 3-10 zeigt den Vergleich der Housekeeping Gene.

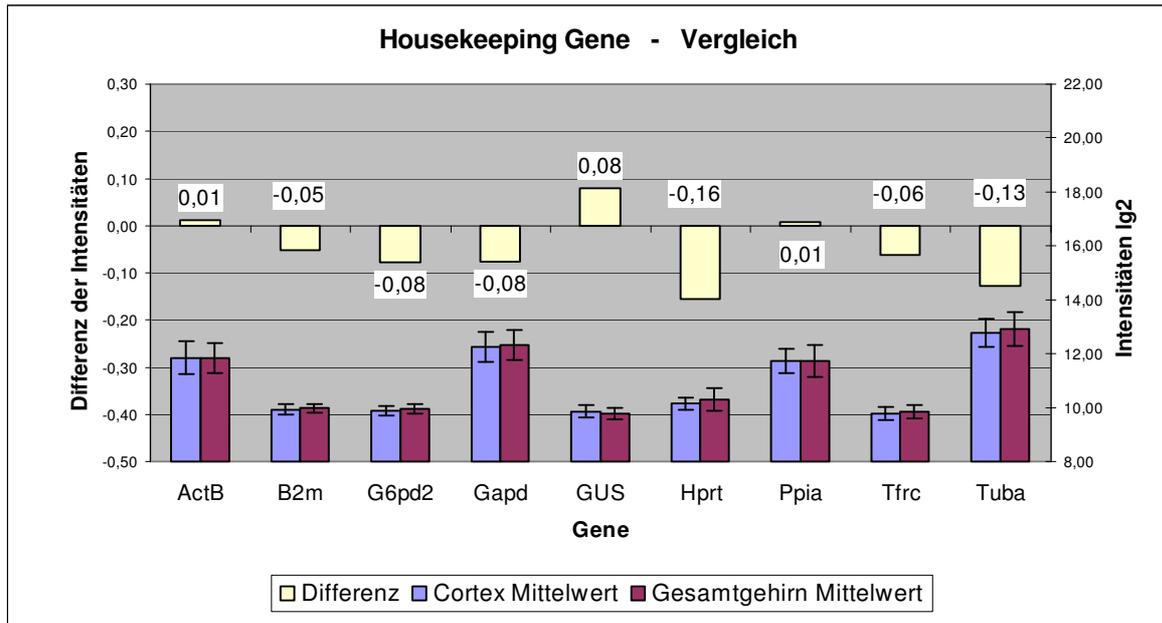
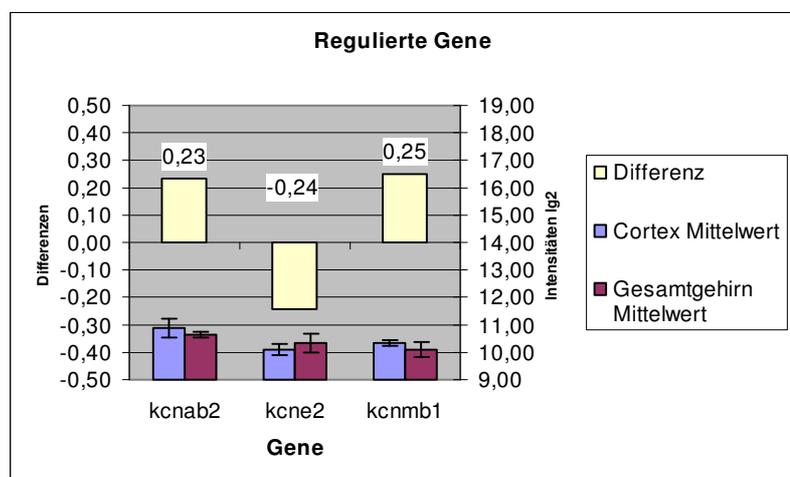


Abb. 3-10 Vergleich der Housekeeping Gene im Verhältnis Cortex zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Wie zuvor beschrieben, weisen die vier Housekeeper β -Aktin, GAPD, Ppia und α -Tubulin relativ hohe Intensitäten auf, was mit der für das Gehirn zu erwartenden Genexpression übereinstimmt. Die anderen Housekeeper treten wie im Gehirn zu erwarten eher gering auf. Im Wesentlichen zeigen sich keine auffälligen Intensitätsdifferenzen bei den Housekeeping Genen.

Abb. 3-11 zeigt die wenigen als reguliert erscheinenden Kaliumkanal-Gene. Auch bei diesen Genen zeigen sich kaum auffällige Differenzen in den Intensitäten.

Abb. 3-11 Als reguliert auftretende Gene im Verhältnis Cortex zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)



Die im Zusammenhang der Arbeit des Lehrstuhls interessantesten Gene sind in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt. Sie zeigen die *kcnj*- und die *kcnk* – Kaliumkanal-Genfamilien.

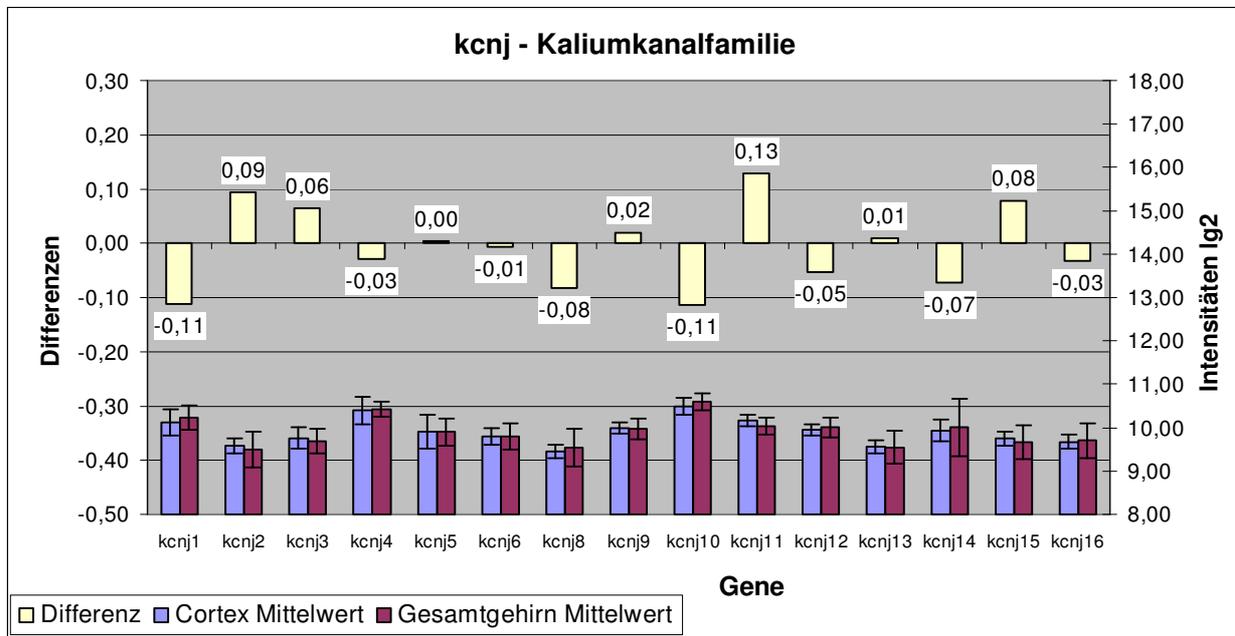


Abb. 3-12 Vergleich der Gene der *kcnj*-Kaliumkanalfamilie
 im Verhältnis Cortex zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede
 Nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

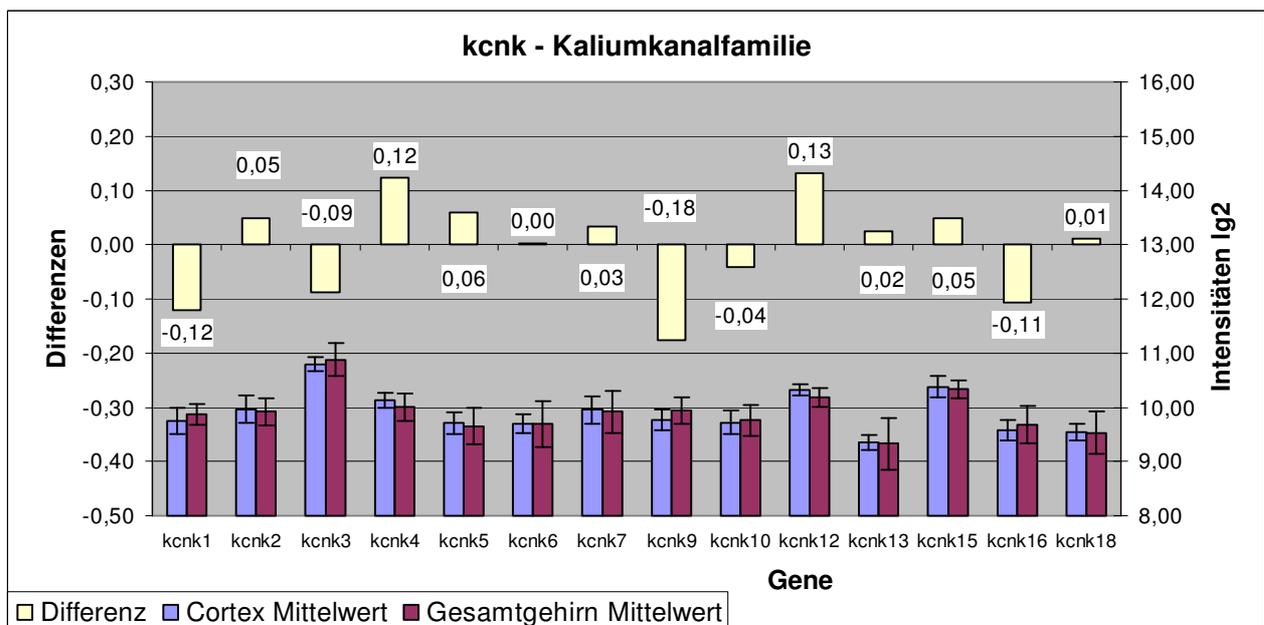


Abb. 3-13 Vergleich der Gene der *kcnk*-Kaliumkanalfamilie
 im Verhältnis Cortex zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede
 Nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

3.2 Methodenentwicklung und Testmessungen

Zusammenfassend kann man feststellen, dass der Vergleich von Cortex und Gesamtgehirn kaum Unterschiede erbrachte. Angesichts dessen, dass der Cortex mit einem prozentualen Gewebeanteil von knapp 50 % bei den von uns untersuchten Tieren den größten Teil des gesamten Gehirnes ausmacht, war dieses Ergebnis nicht überraschend.

Vergleich Kleinhirn und Gesamtgehirn bei der Mauslinie CD1

Im zweiten Teil der Untersuchung einzelner Gehirnabschnitte wurde die Genexpression des Kleinhirns mit dem des gesamten Gehirnes verglichen.

Für die Versuchsdurchführung wurden die aus der gleichen Präparation gewonnen RNA-Pools eingesetzt wie beim Vergleich von Cortex mit Gesamtgehirn. Dementsprechend basieren die Daten auf ca. 8 Wochen alten Männchen der CD1-Mauslinie.

Die Messung erfolgte in zwei Experimenten unter Anwendung eines *Dye-Switches*. Die Auswertung basiert auf einer Logarithmierung zur Basis 2, der Normalisierung nach Lowess und einer Angleichung der beiden Datensätze aufeinander durch Subtraktion bzw. Addition entsprechend den Mittelwerten.

Abb. 3-14 zeigt die Relation der Genexpression der Housekeeping Gene. Alle Gene zeigen eine verglichen mit dem Gesamtgehirn deutlich reduzierte Genexpression im Kleinhirn.

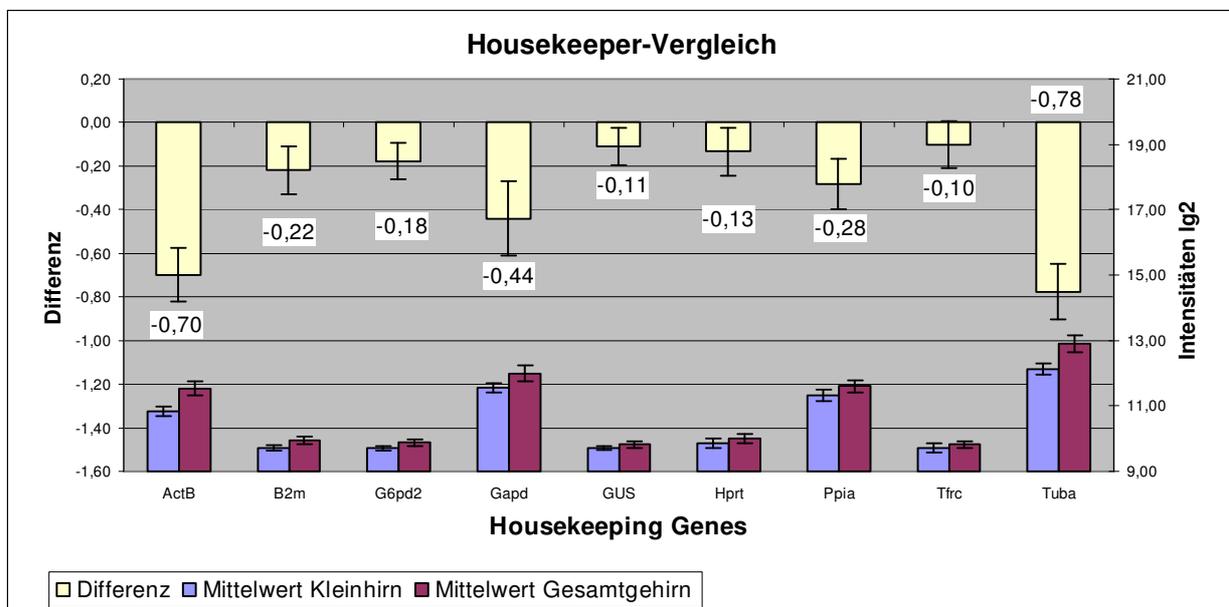


Abb. 3-14 Vergleich der Housekeeping Gene
im Verhältnis Kleinhirn zu Gesamtgehirn
(Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur
Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Das Ergebnis zeigt, dass im Kleinhirn verhältnismäßig weniger mRNA dieser Gene vorhanden ist, als im sonstigen Gewebe. Die Gründe dafür sind wohl in Funktion und Bedeutung des Kleinhirns zu suchen.

Hinsichtlich der Kaliumkanal-Gene sind beim Kleinhirn im Gegensatz zum Cortex einige Veränderungen in der relativen Genexpression zum Gesamtgehirn zu beobachten. Abb. 3-15 zeigt die differentiell exprimierten Gene.

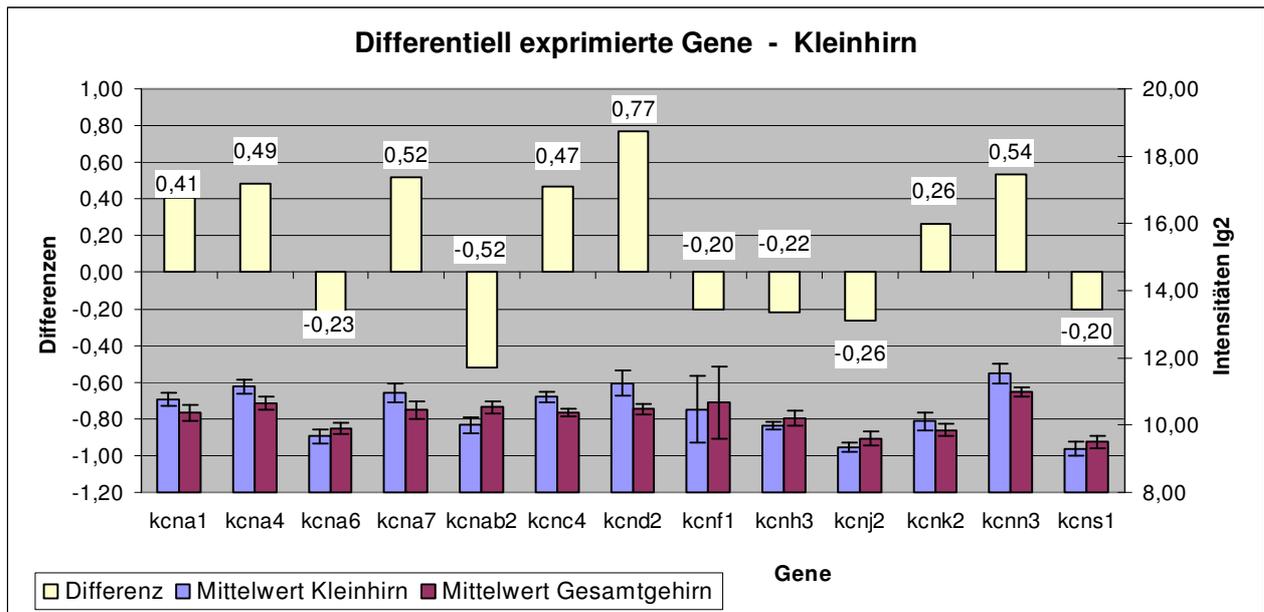


Abb. 3-15 Als reguliert auftretende Gene
 im Verhältnis Kleinhirn zu Gesamtgehirn
 (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung
 zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Die drei Kv-Kanäle *kcna1*, *kcna4* und *kcna7* zeigen eine um ca. 50% höhere Genexpression im Kleinhirn im Vergleich mit dem Gesamthirn. Diese drei Gene werden zwar bekannter weise weit verbreitet im Gehirn exprimiert, zeigen ihre maximale Expression jedoch tatsächlich im Kleinhirn [0502]. Die beiden Gene *kcna6* und die β -Kaliumkanal-Untereinheit *kcnab2* werden ebenfalls in vielen Bereichen des Gehirnes exprimiert, meinen Messungen zufolge jedoch nur in geringem Maß im Kleinhirn.

Die Gene *kcnc4* und *kcnn3* werden laut Literaturangaben im Bereich des Cortex gar nicht exprimiert, sondern hauptsächlich in den Bereichen Hirnstamm, Hippocampus und Kleinhirn [0502]. Das bestätigt sich in den relativ erhöhten Expressionswerten auf meinem Microarray. Sehr interessant ist das Gen *kcnd2*. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Gen mit höchster Präferenz im Cerebellum exprimiert wird, gefolgt vom Hippocampus und Thalamus

[0502]. Im Bereich des Cortex tritt dieses Gen nur sehr konzentriert in Dendriten und Soma auf. Daher entspricht das Ergebnis des Microarray-Versuches genau dem für *kcnd2* zu erwartenden Genexpressionsstatus.

Die drei Gene *kcnf1*, *kcnh3* und *kcnsl1* zeigen nur geringe Differenzen. Die Intensitäten von *kcnf1* weisen sehr hohe Standardabweichungen auf, so dass dieses Einzelergebnis nicht zu bewerten ist. Die Gene *kcnh3* und *kcnsl1* zeigen geringe Intensitäten, was ihrer bekannt schwachen Expression entspricht. In größtem Maße werden diese Gene laut früheren Messungen im Cortex exprimiert [0502], so dass die verhältnismäßig geringere Expression im Kleinhirn nachvollziehbar ist.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die beiden Kaliumkanal-Familien *kcnj* und *kcnk* dargestellt.

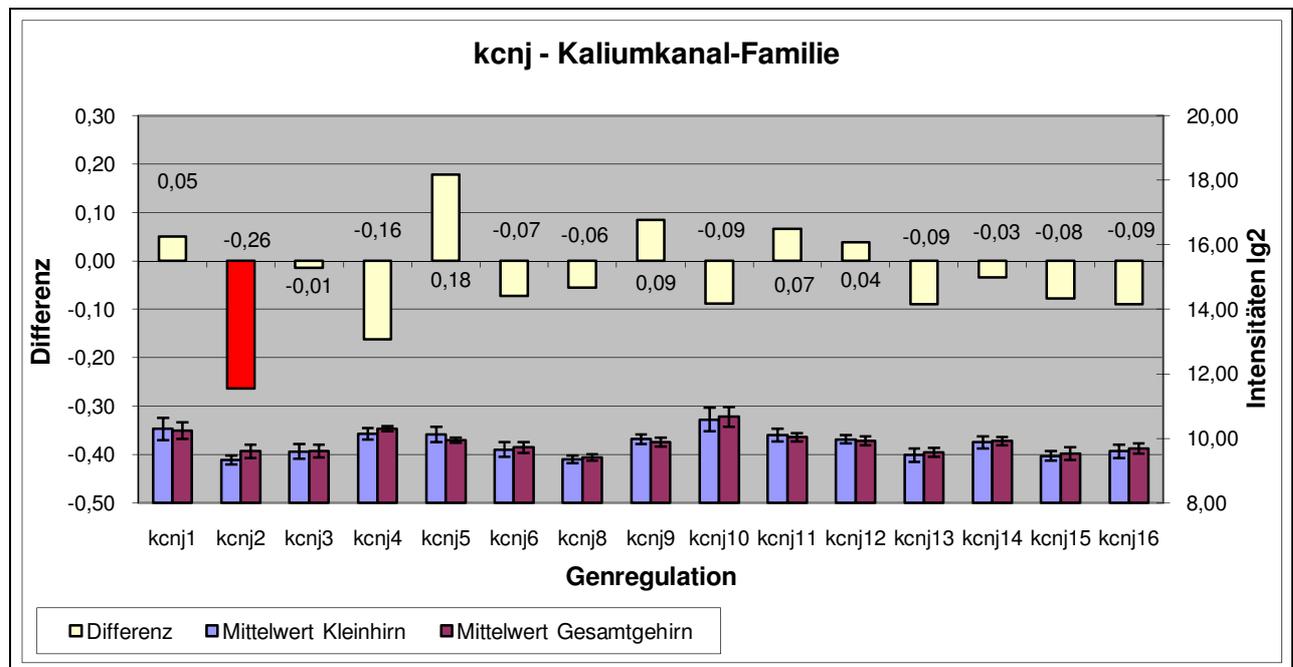


Abb. 3-16 Vergleich der Gene der *kcnj*-Kaliumkanalfamilie im Verhältnis Kleinhirn zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Abb. 3-16 zeigt die Differenzen beim Vergleich der *kcnj*-Gene im Kleinhirn im Verhältnis zum Gesamtgehirn. Nur wenige Gene zeigen deutliche Unterschiede in der Genexpression. Im Wesentlichen betrifft es *kcnj2*. Dieses Gen wird im Gehirn hauptsächlich im Vorderhirn exprimiert und weist daher eine verhältnismäßig geringere Genexpression auf. Ähnliches gilt für *kcnj4*. *Kcnj5* dagegen – eigentlich ein typischer Herz-Kaliumkanal – tritt in geringem

Maße im Gehirn und dort vor allem im Cerebellum auf, weshalb eine verhältnismäßig höhere Genexpression zu erwarten war.

Die Expressionsdaten aller *kcnj*-Kaliumkanäle liegen im Vergleich zu den anderen Werten der Datensätze eher im unteren Bereich. Dies erklärt sich durch die im Verhältnis zu anderen Genen wie den Housekeepern eher geringen Genexpression dieser Gene. Verglichen mit diesen aufgrund ihrer Bedeutung sehr stark exprimierten Genen liegen die Expressionsraten der Kaliumkanäle um 1000- bis 10000-fach niedriger. Wie zuvor beschrieben, gibt die Intensität keine genaue Auskunft über die wahre Genexpression. Expressions-Unterschiede dieser Größe lassen sich jedoch sehr gut nachvollziehen.

Gleiches gilt für die *kcnk*-Genfamilie. Auch diese Gene weisen deutlich geringere Intensitäten auf als z.B. die Housekeeping Gene.

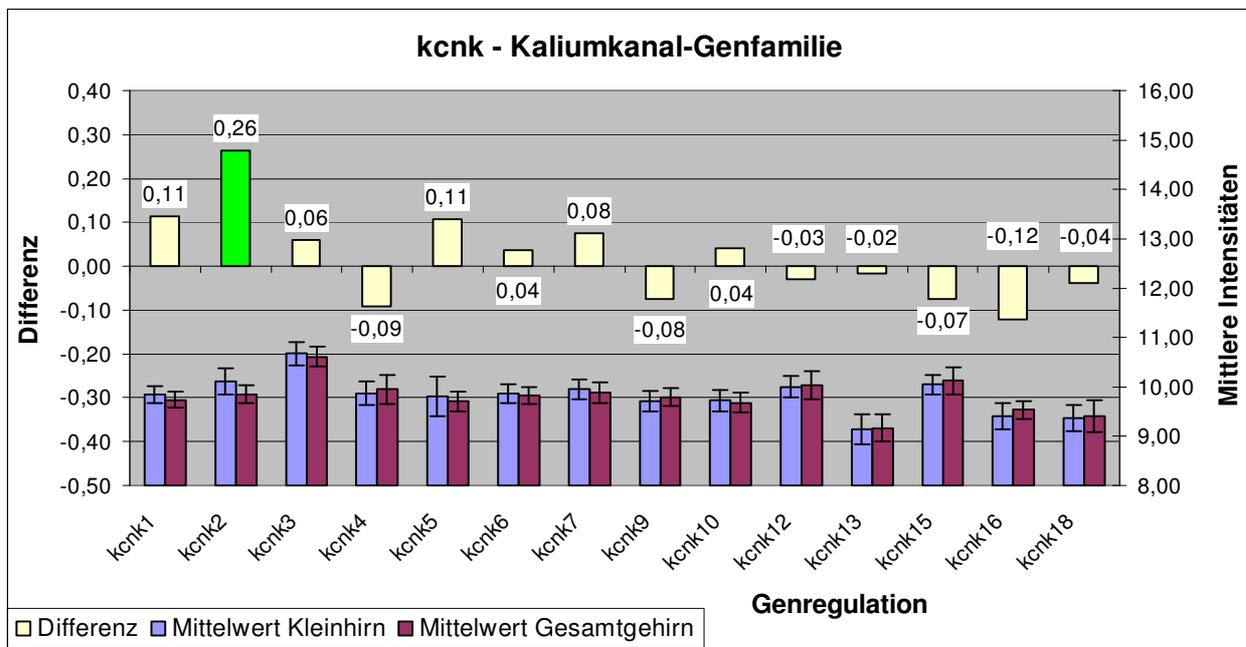


Abb. 3-17 Vergleich der Gene der *kcnk*-Kaliumkanalfamilie im Verhältnis Kleinhirn zu Gesamtgehirn (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Der einzige Kaliumkanal dieser Familie, bei dem eine unterschiedliche Expression angezeigt wird, ist *kcnk2* (TREK1).

Dieses Ergebnis widerspricht Ergebnissen zum humanen TREK1-Kanal, welcher im Kleinhirn im Verhältnis zu den anderen Hirnbereichen und damit auch zum Gesamtgehirn in deutlich geringerem Maße exprimiert wird [0107]. Gleiches gilt auch für *kcnk9*, welcher im

humanen Kleinhirn ebenfalls in höherem Maße exprimiert wird als durchschnittlich im Gehirn.

Für alle anderen Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle, deren Verteilung im humanen Gehirn untersucht worden war (0107), stimmen die Beobachtungen für Mensch und Maus jedoch überein: *kcnk1*, *kcnk6*, *kcnk10*, *kcnk4* und *kcnk3*.

Zusammenfassend zeigen diese Kontrollversuche, bei denen die Expression in Cortex und Cerebellum mit dem Gesamthirn verglichen wurde, dass die Microarray-Methode die Ergebnisse früherer Messungen mit anderen Methoden in großem Maße bestätigen konnte. Diese Feststellung bestätigt die Richtigkeit der Methode und gibt Aufschluss über die zu erwartenden Messdaten und deren Wert.

3.3 Auswertung und Datentransformation

Das folgende Kapitel befasst sich mit den Grundlagen der Datentransformation und den verschiedenen möglichen Auswertungsstrategien. Außerdem werde ich auf die Grundlagen der Normalisierung, Berechnung der Regulationswerte und auf den Vergleich mehrerer aus Microarray-Experimenten resultierender Datensätze eingehen.

Die Auswertung eines Microarray-Experimentes kann in verschiedene Abschnitte eingeteilt werden:

- Erfassung des Hybridisierungs-Bildes und Umwandeln des Bildes in numerische Daten
- Normalisierung
- Datenanalyse bzw. Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede
- Vergleich mehrerer Datensätze

Jeder dieser Abschnitte kann auf ganz unterschiedliche Weise angegangen und durchgeführt werden. Es gibt eine Vielzahl von Wahlmöglichkeiten, wobei jede in der weiteren Auswertung zu unterschiedlichen Konsequenzen führt. Ich werde wenn möglich, in jedem Abschnitt mehrere Auswertungsstrategien vorstellen und dann hinsichtlich der Vor- und Nachteile beschreiben.

3.3.1 Erfassung des Microarray-Bildes (Scannen) und Umwandlung in numerische Daten

Hat man das Microarray-Experiment molekularbiologisch erfolgreich durchgeführt, so erhält man durch die abschließende Messung – das Scannen - jeweils ein Laser-Scan-Bild (Tiff-Format) für jede Farbe, in unserem Fall rot und grün. Es handelt sich dabei um „echte“ Bilder im Sinne von einer Art digitaler Fotografie. Jede Unregelmäßigkeit wird eingefangen, ein heller Hintergrund erschwert z.B. die Sicht auf einzelne schwache Spots.

Abb. 3-19 zeigt das Zweifarben-Bild eines gut gelungen Microarray-Versuches. Alle Spots sind deutlich zu erkennen, je nach Expressionsstatus des Genes und Hybridisierungsintensität unterschiedlich stark. Die Printpuffer-Spots sind dunkel. In einigen Bereichen des Bildes kann man Verunreinigungen erkennen, wie Fussel und Staub. Diese zufälligen Fehler werden in der Auswertung beachtet und eliminiert.

Der weiße Rahmen umzeichnet einen der vier „Grids“ – der Felder, die durch das Spotten einer Nadel entstehen. Die DNA aller Spots innerhalb eines Grids wurde also mit Hilfe der gleichen Nadel aufgebracht.

Innerhalb eines Grids befinden sich je 15 „Säulen“ und 20 „Reihen“, wobei je 5 Säulen nebeneinander die gleichen Spots beinhalten (senkrechte Drittelung innerhalb eines Grids,

siehe Abbildung). Im unteren Bereich sind Housekeeping Gene gespottet, wobei hier alle 15 Spots mit einer DNA gebildet wurden.

Zu den Spots im gerahmten Grid: Bei der sehr hellen linken Fünferkette und der hellen 15er-Kette handelt es sich um die Kontrolle „GFP“. Zwischen den GFP-Spots ist die Kontroll-DNA Luciferase gespottet. Dabei wird zwischen die DNA-haltigen Spots jeweils eine Reihe Printpuffer (Lösungspuffer) aufgetragen. Hier darf nichts binden – der Bereich bleibt schwarz. Die Doppel-Fünferkette im rechten Abschnitt ist Saccharomyces-DNA (Kontrollen). Im rechten Drittel über den Saccharomyces-Genen sind nochmals Housekeeping Gene aufgetragen mit jeweils einer Reihe Printpuffer dazwischen.

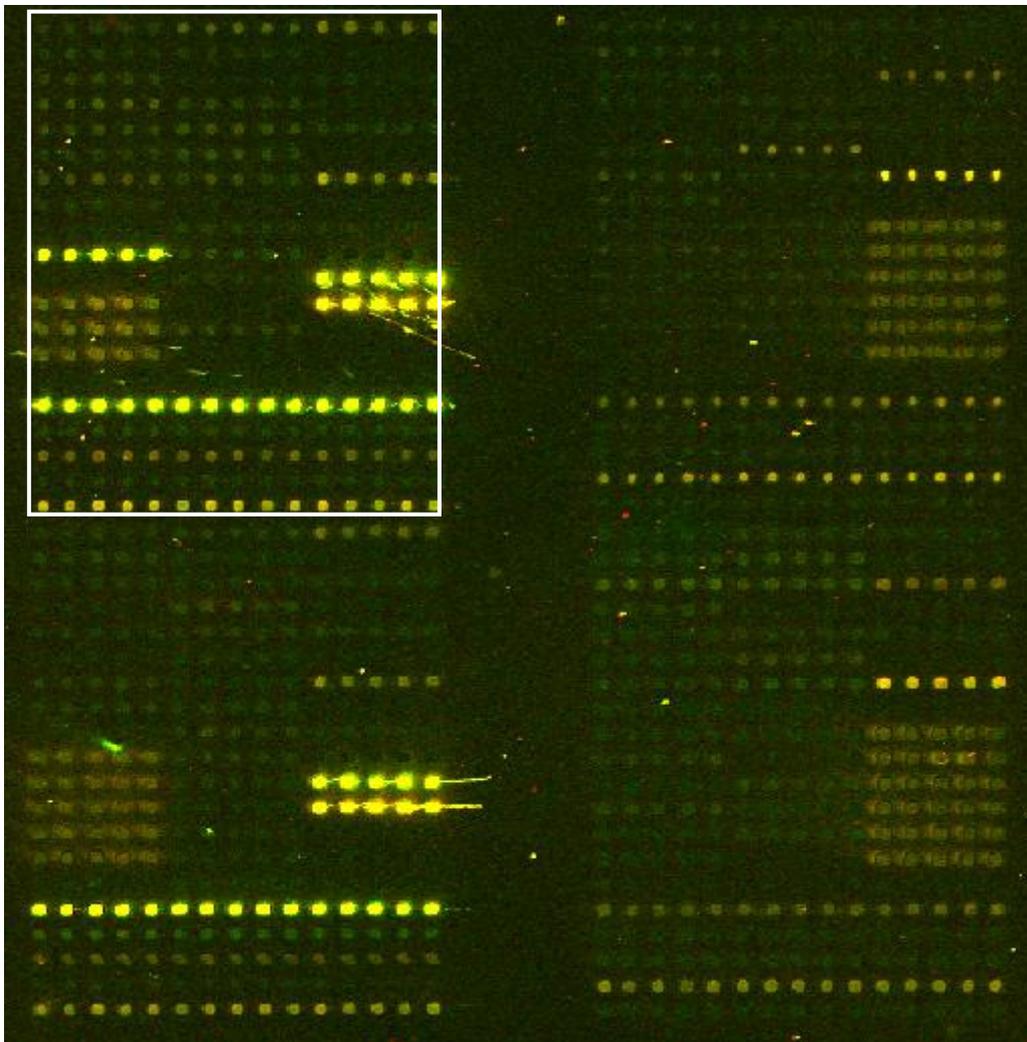


Abb. 3-18 Slide S10, gespottet März 2005, hybridisiert am 23.06.2005 mit CD1-WT adult Pool (Cy3) und C57/BL6-WT adult Pool (Cy5),

Die Qualität der Bilder ist die Grundlage jeder weiteren Auswertung. Deshalb sollte bereits beim Scannen die Einstellung solange optimiert werden, bis bereits mit Hilfe der Scan-

Software möglichst gute Bilder mit deutlichen Spots und dunklem Hintergrund zu erreichen sind. Ziel dabei ist es, den Farbbereich (2^{16} Graustufen = 16-Bit Bild) möglichst optimal auszunutzen, d.h. eine möglichst gute Aufspaltung der niederen Werte zu erreichen, ohne dabei jedoch eine Sättigung der hohen Werte hervorzurufen. Umso intensiver der Hintergrund, desto schlechter lässt sich dieses Ziel umsetzen. Folglich wird ein Kompromiss angestrebt, der dem gestellten Optimum möglichst nahe kommt. Moderne Scan-Software ist außerdem in der Lage bereits während des Scannens eine Angleichung der Bildhelligkeit und damit Spot-Intensität zwischen den beiden Farben herzustellen. Umso näher hier die beiden Farben aneinander angeglichen werden, desto weniger Bearbeitung bedarf der Datensatz während der rechnerischen Auswertung.

Die beiden Bilder werden gleichzeitig in eine spezielle Microarray-Auswertungs-Software geladen, in unserem Fall in ImaGene6.0. Die Software ist in der Lage, die beiden Bilder exakt übereinander zu legen. Dann wird ein Grid – das Muster der Spot-Anordnung – über die Spots gelegt. Das ist Voraussetzung für die Software, um einzelne Spots zu erkennen. Dabei lässt sich auch der Durchmesser der Spots einstellen. Zum Abschluss dieser ersten Auswertungsphase werden die Intensitäten der Spots bestimmt. Diese Messung basiert auf einer Unterteilung des markierten Spot-Areals in tausende Teilbereiche, für die dann im Einzelnen die Pixel-Dichte bestimmt wird. Für einen normalen, gleichmäßigen Spot ohne Verunreinigungen resultiert eine normalverteilte Wertemenge, aus der die Intensität gemittelt wird. Dafür bieten sich zwei Werte an: der Mittelwert oder der Median. Bei guten Spots mit normalverteilten Werten, unterscheiden Mittelwert und Median sich kaum und können beide für die weitere Auswertung verwendet werden. Die Bedeutung dieser beiden Werte liegt demnach in ihrem Vergleich. Umso ähnlicher Mittelwert und Median sich sind, desto besser ist die Spot-Qualität. Im Umkehrschluss folgt daraus, dass Unterschiede zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich ihrer Ursache führen müssen.

Nehmen wir als Beispiel an, dass der Median kleiner ist als der Mittelwert. Dieses Phänomen resultiert sehr oft aus zu groß gewählten Spotdurchmessern. Es gibt eine große Anzahl von sehr niedrigen Werten aus dem Randbereich und eine kleine Anzahl von hohen Intensitäten aus der Mitte des Spots. Hier könnte man mit einer Anpassung des Spotdurchmessers beim Anlegen des Grids, der ja die eigentlichen Messbereiche vorgibt, eine Verbesserung von Median und Mittelwert erreichen. Genauso könnte aber auch eine Verunreinigung schuld an einem im Vergleich zum Median viel zu hohen Mittelwert sein. Liegt z.B. ein dünner Fussel oder ein Staubkorn im Messbereich, so zeigt sich das im Laserbild als sehr heller Bereich. Die

betroffenen Spots müssen entsprechend als Ausreißer markiert und für die weitere Auswertung außer Acht gelassen werden.

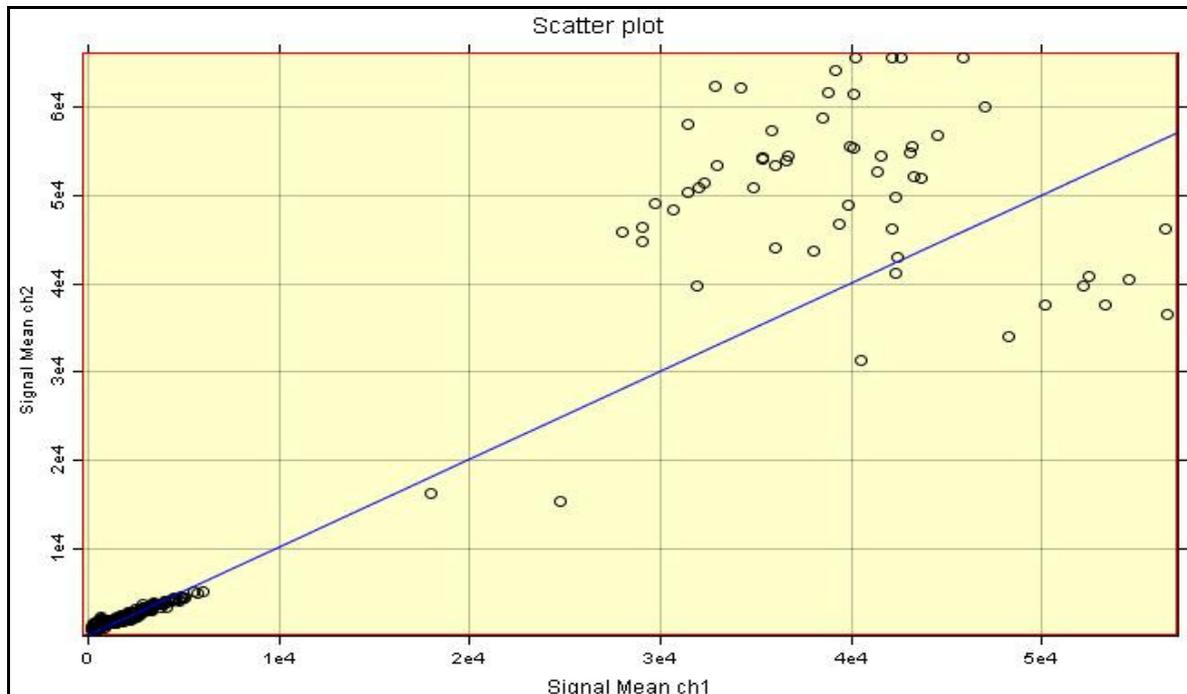


Abb. 3-19 Scatterplot, unbehandelte Werte

Slide S10, gespottet März 2005, hybridisiert am 23.06.2005 mit
CD1-WT adult Pool (Cy3) und C57/BL6-WT adult Pool (Cy5)

Die ermittelten Daten werden in Form von Datentabellen ausgegeben. Außerdem können sie in verschiedenen Plots dargestellt werden. Für jeden Spot werden dabei Mittelwert und Median sowie Mittelwert und Median des lokalen Hintergrunds aufgeführt.

Abb. 3-19 zeigt den Scatterplot des Datensatzes für den oben gezeigten Slide. Auf x- bzw. y-Achse werden die Intensitäten für beide Farben aufgetragen. Bei gleichen Intensitätswerten liegt der Datenpunkt entsprechend auf der Regressionslinie bei 1. Die gezeigten Daten sind völlig unbehandelt. Typisch ist die Verteilung auf eine große Menge Werte mit relativen kleinen Intensitäten und auf eine kleine Menge Werte mit sehr hohen Intensitäten, bei welchen es sich hauptsächlich um Kontrollen und Housekeeper handelt.

Im zweiten Schritt können die Daten logarithmiert werden. Durch die Logarithmierung wird die für Microarraydaten typische exponentielle Verteilung (viele ‚unexprimierte‘ Gene, der Großteil der ‚exprimierten‘ Gene besitzt eine moderate Signalstärke und nur ein kleiner Teil der Werte ist wirklich stark exprimiert) in eine annähernd normalverteilte Verteilung

umgewandelt. Dies erfolgt vor allem, da die meisten Normalisierungsverfahren auf der Annahme einer Normalverteilung basieren.

Abb. 3-20 zeigt die gleichen Werte wie der Scatterplot zuvor, jedoch diesmal in logarithmierter Form zur Basis 2. Bei der Logarithmierung der Daten können neben der Basis 2 auch der dekadische und der natürliche Logarithmus eingesetzt werden.

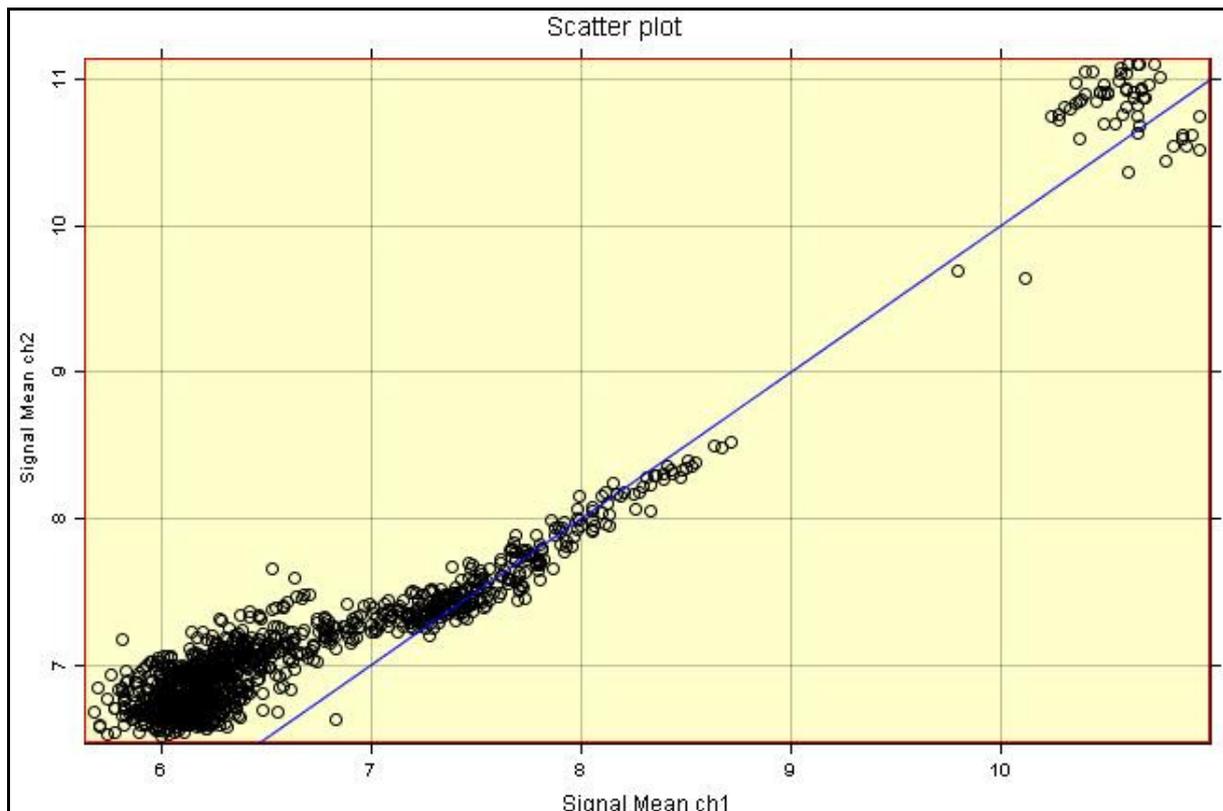


Abb. 3-20 Scatterplot, Werte logarithmiert zur Basis 2
Slide S10, gespottet März 2005, hybridisiert am 23.06.2005 mit
CD1-WT adult Pool (Cy3) und C57/BL6-WT adult Pool (Cy5)

Wie in der Abbildung ersichtlich, werden die Werte aufgefächert und im Gegensatz zum vorhergehenden Scatterplot ist die Abweichung der niedrigsten Intensitäten von der Regressionsgeraden deutlich zu erkennen.

Zum Abschluss der Grund-Auswertung können die einzelnen Spotpaare direkt miteinander verglichen werden. Allerdings sollte eine Normalisierung der Daten durchgeführt werden, bevor die relativen Genexpressionswerte ermittelt werden. Deshalb werde ich nach dem Kapitel zur Normalisierung näher auf den Vergleich der Intensitäten – die Berechnung der Ergebnisse - eingehen.

3.3.2 Normalisierung

Bei der Normalisierung unterscheidet man die Normalisierung der beiden Datensätze auf einem Microarray und die Normalisierung mehrerer Datensätze aus mehreren Experimenten. Darauf wird in Kapitel 3.3.4 näher eingegangen.

Im ersten Schritt der Auswertung erhält man zwei voneinander unabhängige Datensätze. Im zweiten Schritt müssen die Ähnlichkeiten der Datensätze überprüft und die Datensätze aneinander angepasst werden. Dafür bietet es sich z.B. an, die Mittelwerte aller mittleren Intensitäten miteinander zu vergleichen. Sind sie sich sehr ähnlich, dann passen die beiden Datensätze schon ganz gut zueinander und eine Normalisierung muss nicht zwingend durchgeführt werden. Allerdings muss man auch hier wieder zu bedenken geben, dass bei der Normalisierung nicht nur eine Anpassung der Datensätze zueinander stattfinden kann, sondern je nach Methode auch die innere Struktur jedes einzelnen Datensatzes neu berechnet wird, so dass sowohl systematische als auch zufällige Fehler korrigiert werden können [0203]. Wie zuvor erwähnt sind für zufällige Fehler vor allem Verunreinigungen auf der Slide-Oberfläche verantwortlich sowie Verunreinigungen der RNA oder ähnliches. Der systematische Fehler ist neben dem Einsatz unterschiedlicher RNA-Mengen in vielen Fällen auf die Eigenheiten der Farbstoffe zurückzuführen. [0202]:

- physikochemische Eigenschaften der Farbstoffe wie Hitze- und Licht-Empfindlichkeit,
- Effizienz beim Einbau der Farbstoff-gekoppelten Nukleotide,
- experimentelle Variabilität während der Hybridisierung und Messung
- Scanner-Einstellungen, da die Bilder beider Farbstoffe einzeln aufgenommen werden.

Die Normalisierung soll demnach vor allem den systematischen Fehler minimieren, um eine Darstellung und Berechnung der zum Teil geringen biologischen Unterschiede zu ermöglichen.

Der in Abb. 3-20 gezeigte Scatterplot für den zuvor abgebildeten Slide zeigt, dass sich ein Großteil der Daten im unteren Bereich neben der Regressionsgerade befindet. Für eine weitere Auswertung müssen die Werte so aufeinander angeglichen werden, dass der systematische Fehler, der zum Unterschied zwischen den beiden Datensätzen führt, berichtigt wird.

Die folgende Abbildung [Abb.3-21] zeigt die Daten des zuvor abgebildeten Slides nach der Normalisierung der zuvor zur Basis 2 logarithmierten Daten nach Lowess (Die Normalisierungsmethode nach Lowess wird im Folgenden noch näher erläutert).

Der Unterschied zu den vorhergehenden Scatterplots lässt sich deutlich erkennen. Der Wertebereich zieht sich in der Mitte zusammen und zentriert sich deutlich um die Regressionsgerade.

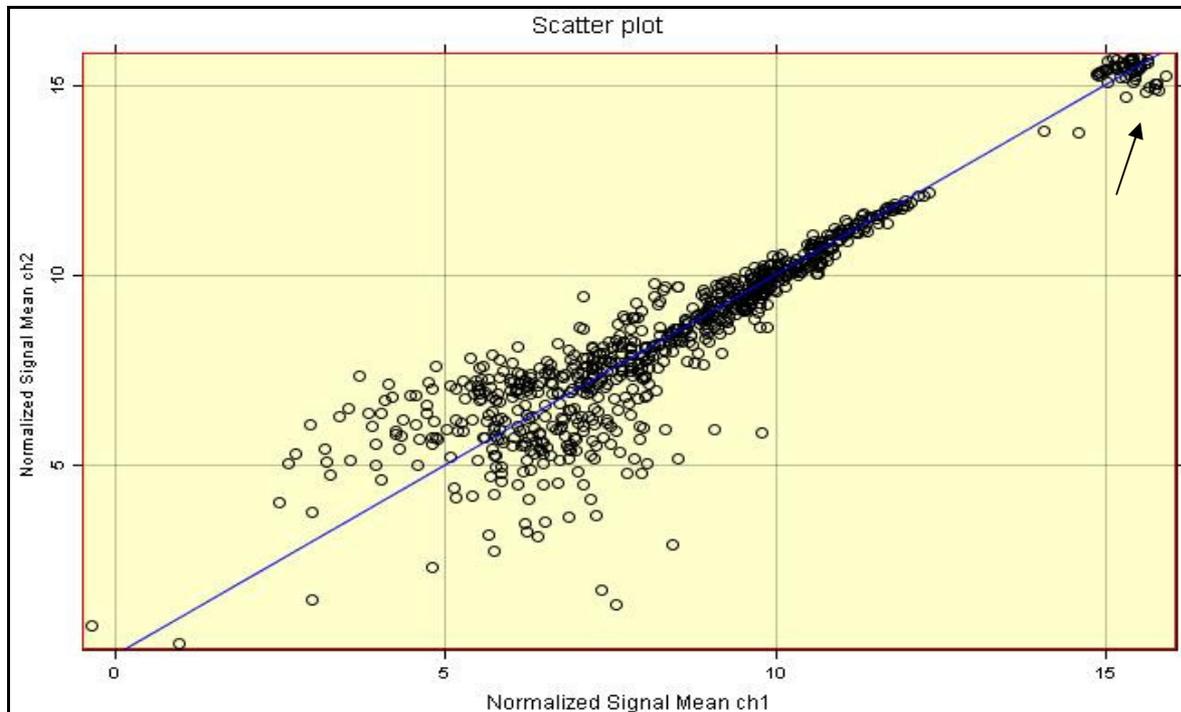


Abb. 3-21 Scatterplot, Werte logarithmiert zur Basis 2, normalisiert nach Lowess

Slide S10, gespottet März 2005, hybridisiert am 23.06.2005 mit CD1-WT adult Pool (Cy3) und C57/BL6-WT adult Pool (Cy5)

Aufmerksam machen möchte ich auf eine kleine Gruppe von Datenpunkten, die in Abb. 3-20 rechts von der Regressionsgeraden liegt. Diese kleine Gruppe zeigt sich auch in der letzten Abb. 3-21 ganz oben rechts unterhalb der Regressionsgerade. Dabei handelt es sich um das Kontrollgen „Saccharomyces 1“, das im Verhältnis 1:3 eingesetzt wurde und jetzt auch entsprechend neben der Regressionsgeraden zu erwarten war.

Yang et al fassen folgende Normalisierungsmethoden zusammen [0202]:

Global normalization: Die Datensätze beider Farbstoffe werden unter Annahme eines konstanten Faktors in Bezug gesetzt. Dafür wird z.B. Median oder Mittelwert aller Spotintensitäten herangezogen.

Within-print tip group normalization: entspricht der „global normalization“, wobei aber nicht alle Werte für die Berechnung des Faktors eingesetzt werden, sondern nur eine

Normalisierung innerhalb eines “grids” erfolgt (vergleiche Abb. 3-18: 4 Grids!). Es können auch verschiedene Normalisierungsmethoden innerhalb eines grids angewendet werden.

Scale normalization: auf Basis der durchgeführten „*Within-print tip group normalization*“ werden die einzelnen Grids miteinander verglichen, in Relation gesetzt und entsprechend dem daraus resultierenden Faktor angepasst.

Intensity-dependent normalization: die Lowess-Methode. Im Englischen wird die Methode auch als “*Scatter plot smoother*” bezeichnet (von „*locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) algorithm*“). Die Daten werden an die Regressionsgerade bei 1 angeglichen, so dass zum einen nur geringe Änderungen der Werte auftreten und zum anderen die unterschiedlich exprimierten Gene ihre Relationswerte behalten. Es handelt sich also um eine Näherungsberechnung, die die folgenden vier Faktoren berücksichtigt: „*polynomial order d*“, „*number of LOWESS algorithmic iterations t*“, „*weight function w(·)*“ und „*fraction of the data points used in the local regression f*“ (vgl. Faktor $h_i(A_j)$ in der folgenden Formel, der diese Faktoren zusammenfasst).

Die Normalisierung nach Lowess erfolgt nach folgender Berechnung [0402, 0203]:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|--------------------------------|---|-------------------|----|-----------------|---|--|---|-----------|---|-------------|------------|--|
| $A_i = \log_2(\sqrt{I_i^r \cdot I_i^g})$ $M_i = \log_2(I_i^r / I_i^g)$ $M_L = \sum_{i=1}^n h_i(A_j) M_i$ | <table border="0"> <tr> <td>A</td> <td>Average fluorescence intensity</td> </tr> <tr> <td>M</td> <td>transformed ratio</td> </tr> <tr> <td>ML</td> <td>LOWESS estimate</td> </tr> <tr> <td>i</td> <td>i = 1,2,...n (n=total number of spots)</td> </tr> <tr> <td>r</td> <td>red (Cy3)</td> </tr> <tr> <td>g</td> <td>green (Cy5)</td> </tr> <tr> <td>$h_i(A_j)$</td> <td>values of the weights (depending on A, not on M)</td> </tr> </table> | A | Average fluorescence intensity | M | transformed ratio | ML | LOWESS estimate | i | i = 1,2,...n (n=total number of spots) | r | red (Cy3) | g | green (Cy5) | $h_i(A_j)$ | values of the weights (depending on A, not on M) |
| A | Average fluorescence intensity | | | | | | | | | | | | | | |
| M | transformed ratio | | | | | | | | | | | | | | |
| ML | LOWESS estimate | | | | | | | | | | | | | | |
| i | i = 1,2,...n (n=total number of spots) | | | | | | | | | | | | | | |
| r | red (Cy3) | | | | | | | | | | | | | | |
| g | green (Cy5) | | | | | | | | | | | | | | |
| $h_i(A_j)$ | values of the weights (depending on A, not on M) | | | | | | | | | | | | | | |

Bei Yang nicht aufgeführt ist die Normalisierung durch Lineare Regression. Die so behandelten Werte werden meist so stark verändert, dass nur sehr hohe relative Regulationsbeträge zu erkennen sind.

Grundlegend bei der Normalisierung und der Auswahl der Methode ist die Basis der Normalisierungsberechnung [0203]. Als Basis sind die Intensitäts-Werte zu sehen, die zur Berechnung der Korrekturfaktoren herangezogen werden. Ab einer gewissen Spotanzahl und –vielfalt ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Teil der untersuchten Gene reguliert ist, d.h. unterschiedlich exprimiert wird. Damit kann der gesamte Datensatz als Basis bzw. Bezug

der Normalisierung genutzt werden. Sind wie in unserem Fall möglicherweise viele Gene von einer Regulation betroffen, empfiehlt es sich, Interne (Housekeeping Gene) oder Externe (Kontrollen) Standards als Bezug auszuwählen.

Wie zuvor beschrieben, haben wir für diesen Zweck eine große Anzahl Housekeeper gespottet, um deren Intensitäten zur Normalisierung nutzen zu können. Diese durchaus gängige Methode hat sich allerdings im Zuge unserer Experimente als schwierig herausgestellt, was auch in vielen Gesprächen mit anderen Anwendern bestätigt wurde. Der Nachteil liegt ganz klar darin, dass man bei der Untersuchung zweier unterschiedlicher Mäuse oder Mausstämme nie ganz sicher sein kann, ob und welche Housekeeper tatsächlich in genau gleicher Menge exprimiert werden und daher als Basis der Normalisierung einsetzbar sind. Unsere Testmessungen mit Mäusen des Wildtyp-Stammes CD1 zum Vergleich von Tieren unterschiedlichen Alters (vgl. Kapitel 4.1) zeigen deutlich die unterschiedlichen Genexpressionslevel der Housekeeping Gene. Ein ähnliches Problem zeigt sich auch bei den externen Standards. Die erforderliche Kontroll-RNA wird der zu untersuchenden Maus-RNA vor der Transkription in kleiner Menge zugesetzt, was wiederum mit einem Fehler behaftet ist. Kleine Abweichungen beim Pipettieren haben hier enorm große Folgen, so dass der Bezug auf diese externen Standards ebenfalls nur eingeschränkt empfehlenswert ist. Dieses Problem kann man ansatzweise lösen, indem man pro Farbstoff jeweils einen Pool der einzusetzenden Kontrollen bildet, welche im Folgenden für eine ganze Reihe von Experimenten eingesetzt wird. Sollte in einem der beiden Pools eine der Kontroll-RNAs in größerer Menge vorhanden sein, so wird sich diese Abweichung in vielen Experimenten zeigen und als stetiger systematischer Fehler bekannt sein. Der Einsatz dieser Kontroll-Pools erweist sich nicht nur für die Normalisierung als sehr sinnvoll, sondern ist auch zur generellen Überprüfung der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit ein sehr gutes Hilfsmittel.

Die Bezugnahme auf einen Teil der Messdaten ist dementsprechend mit der Gefahr verbunden, einen weiteren systematischen Fehler in die Daten einzuführen. Die Alternative ist eine Normalisierung unter Bezug auf alle Daten. Der Nachteil bei dieser Form der Auswertung ist, dass es bei kleinen cDNA-Arrays mit wenigen Spots leicht passieren kann, dass man sich „die Ergebnisse wegchnet“. Das, was innerhalb der Normalisierung als systematischer Fehler erkannt wird, kann in Wahrheit echte Regulation sein. So wird ein Teil der Unterschiede in der Genexpression nicht mehr als solche zu erkennen sein, weil sie unter die willkürlich gesetzten Datenfilter fallen und der Rest der relativen Regulationen wird hinsichtlich des Betrages als viel kleiner resultieren als in Wahrheit aufgetreten. Dem Problem Datenfilter kann man natürlich begegnen, indem man die Filtergrenzen entsprechend anpasst.

Bei unbehandelten oder einfach normalisierten Daten ohne Logarithmierung geht man dann von einer Regulation aus, wenn ein Unterschied in der Genexpression von über 100% erreicht wird (Zur Berechnung: vgl. Kapitel 3.3.3). Bei sehr stringent normalisierten Daten unter Anwendung entsprechender strenger Datenfilter bei der Standardabweichung der Intensitäten und bei guter Experiment-Qualität, die im Vorfeld des Versuches mit einer Vielzahl von vorbereitenden Experimenten auf ihre Robustheit und Reproduzierbarkeit getestet wurde, kann man bereits ab einem Genexpressionsunterschied von mehr als 10% von Regulation, also unterschiedlicher Genexpression sprechen.

Man kann also ohne Zweifel sagen, dass mit der Auswahl der Normalisierungsmethode eine der wichtigsten Entscheidungen für das Microarray-Experiment getroffen wird. Letztendlich muss sich jeder Anwender im Laufe seiner Methodenentwicklung für eine Auswertungs-Strategie entscheiden, indem er viele Möglichkeiten austestet, sie miteinander vergleicht und wenn möglich, die Richtigkeit der ermittelten Ergebnisse überprüft. Daten, die sich z.B. in einer neuen Spotting-Charge oder nach einer Methoden-Änderung reproduzieren lassen, weisen auf die Wahl der richtigen Normalisierungsmethode und Auswertungs-Strategie hin.

Wie der Vergleich aller von der Software angebotenen Normalisierungsformen an einem Testdatensatz gezeigt hat, war in unserem Fall die Anwendung der Normalisierung nach Lowess unter Bezug auf alle Intensitäten die Auswertung der Wahl, da damit, wie sich in den folgenden Messungen bestätigt hat, eine gute Reproduzierbarkeit der Daten auch nach Slide- und Methodenwechsel (siehe Kapitel 4.2.1 Unterpunkt: „*Ergebnisse weiterer Messungen zum Vergleich TRESK-Knockout- mit Wildtyp-Gehirn*“) gezeigt werden konnte.

3.3.3 Datenanalyse bzw. Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede

Nach Abschluss der Normalisierung oder ggf. ohne Normalisierung werden die beiden Datensätze miteinander verglichen, indem die Spotintensitäten jedes einzelnen Spots für beide Farben in Relation gesetzt werden.

Im Falle von logarithmierten Datensätzen werden die Werte ins Verhältnis gesetzt, indem sie voneinander subtrahiert werden ($\log(a) / \log(b)$ ist gleich $\log(a-b)$). Unlogarithmierte Daten werden ins Verhältnis gesetzt, indem die Experiment-Intensität durch die Kontroll-Intensität geteilt wird. Wird das Verhältnis durch Division bestimmt, so bedeutet ein Wert von 1, dass keine Regulation vorliegt, ein Wert von 2 eine 100%ige (2-fache) Hoch-Regulation und ein Wert von 0,5 eine 100%ige (2-fache) Down-Regulation. Bei zur Basis 2 logarithmierten Werten dagegen zeigt die „0“ keine Reaktion, die „1“ zweifache Hoch-Regulation und die „-1“ zweifache Down-Regulation an. Auch hier lässt sich der Vorteil der Logarithmierung

erkennen, denn da wird die betragsmäßig gleiche Regulation durch den gleichen Wert bei unterschiedlichem Vorzeichen dargestellt, während bei der unlogarithmierten Form die Verhältnisse der ab-regulierten Werte hinsichtlich ihrer Größe schwerer nachzuvollziehen sind.

Wie im Kapitel Versuchsplanung beschrieben, wurden für jedes Gen 5 Replikate gespottet, um eventuelle Ausreißer entsprechend eliminieren zu können. Im Zuge der Datenanalyse werden die Werte überprüft, Ausreißer entfernt und die Replikate vereinigt. Dabei ist die Frage entscheidend, ob zuerst die Relation bestimmt wird und dann der Mittelwert für Relation, Intensität des Experiment-Wertes und Intensität des Kontrollwertes bestimmt werden oder umgekehrt. Im zweiten Fall, der ja hinsichtlich der Beträge das gleiche Ergebnis haben sollte, ist keine Ermittlung der Standardabweichung für die Relation möglich. Die Standardabweichung ist aber von entscheidender Bedeutung bei der Ergebnis-Beurteilung, weshalb die Methode mit der Vereinigung der Replikate nach der Berechnung der Relation zu bevorzugen ist.

Ein Wort zur statistischen Auswertung der Datensätze. Im Grunde wäre auch für einen Slide – ein einzelnes Experiment – eine statistische Datenanalyse möglich, da pro Experiment für jede RNA-Population fünf Werte ermittelt wurden. Praktisch wird eine derartige statistische Datenanalyse aber nur bei extrem großen Slides durchgeführt, um aus der Vielzahl der Gene Kandidaten herauszufiltern, deren Regulationsdaten einer statistischen Auswertung standhalten. Dabei muss man ohne Zweifel davon ausgehen, dass viele regulierte Gene unentdeckt bleiben, weil sie aufgrund zufälliger Fehler der statistischen Datenanalyse nicht standhalten können und als nicht signifikant geführt werden. Bei sehr großen Slides ist aufgrund der immensen Datenmenge keine Einzelfall-Prüfung möglich, weshalb hier die Anwendung statistischer Methoden unerlässlich ist. Bei kleinen übersichtlichen Arrays besteht im Gegensatz dazu die Möglichkeit alle Gene auf ihre Werte zu überprüfen und dabei auch Gene, die es nicht über die Signifikanzgrenze geschafft haben, als Kandidaten aufzunehmen und in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Eine der grundlegenden Methoden bei der Microarray-Datenanalyse ist die ANOVA – die „*analysis of variance*“. Kerr, Martin und Churchill [0004, 0105] gehen davon aus, dass die durch die verschiedenen Effekte wie Farbstoff, RNA-Qualität, Molekularbiologische Voraussetzungen usw. hervorgerufenen Varianzen sich in einem gewissen Maße zu einer End-Varianz verstärken, in die die Unterschiede in der Genexpression einfließen, was die eigentliche Genexpressionsanalyse so schwierig macht. Die statistische Datenanalyse nach ANOVA kann mithilfe entsprechender Statistik-Programme durchgeführt werden und ist vor

allem bei großen Datensätzen und beim Vergleich mehrerer Experimente miteinander von großer Bedeutung [0105].

3.3.4 Vergleich mehrerer Datensätze

Im Kapitel „Versuchsdesign und Messplanung“ habe ich dargestellt, dass ein Microarray-Versuch meist nicht nur aus einem einzelnen Experiment besteht, sondern aus mindestens zwei Experimenten, allein schon deshalb um den *Dye-Switch* durchführen zu können. Besonders häufig kommt dabei biologisches Versuchsmaterials mehrerer Tiere zum Einsatz. Die Datensätze aller zum Versuch gehörenden Microarrays müssen deshalb zur Endauswertung so transformiert werden, dass sie direkt miteinander verglichen werden können. Die relativen Regulationswerte, die im Zuge der Auswertung jedes einzelnen Experimentes ermittelt wurden, werden nach Zusammenfassung mehrerer Datensätze für Versuchsgruppe und Kontrolle durch neue, den gesamten Versuch abdeckende Regulationswerte ersetzt.

Die erforderliche Transformation der Datensätze hängt von ihrer Qualität und der im ersten Schritt erfolgten Auswertung ab. Datensätze, die alle auf die gleiche Art und Weise z.B. unter Logarithmierung zur Basis 2 und Normalisierung nach Lowess, ausgewertet wurden und in der mittleren Intensität aller Spots eng beieinander liegen, bedürfen nur einer minimalen Anpassung. Komplexere Datensätze bedürfen dagegen umfangreicher Transformations-Strategien wie einer Normalisierung nach Lowess über alle Datensätze.

Die einfachste Normalisierung mehrerer Datensätze aufeinander ist die Angleichung des Mittelwertes der Intensitäten. Dafür werden die Mittelwerte pro Experiment-Datensatz bestimmt, diese dann gemittelt und die nötigen Differenzen pro Datensatz berechnet. Die Differenzen werden dann auf jeden Intensitätswert addiert bzw. subtrahiert, so dass der resultierende neue Mittelwert allen anderen Mittelwerten der transformierten Datensätze entspricht. Auf diese Weise können Unterschiede in der Messstärke ausgeglichen werden, die zu wertmäßig unterschiedlichen Intensitäten geführt haben. Damit werden die Intensitäten direkt miteinander vergleichbar und es lässt sich mit ihnen weiter rechnen. Für jede Tier-Gruppe können dann – egal von welchem Microarray die Daten ursprünglich stammten – die Datensätze vereinigt werden. Dann können Versuchstier-, z.B. Knockout-Gruppe und Kontroll-, z.B. Wildtyp-Gruppe direkt miteinander verglichen werden.

Die Form der Endauswertung ermöglicht den erweiterten Einsatz des zuvor beschriebenen Loop-Systems. Dabei kommen auf einigen Microarrays keine Wildtyp-Proben mehr zum Einsatz, sondern nur noch Versuchstier-Proben. Dennoch sind diese Daten für die

Auswertung und zum Vergleich mit Wildtyp-Proben von im gleichen Versuchszyklus durchgeführten Microarrays einsetzbar. Der Vorteil liegt natürlich im Einsparpotential bei höherem Probendurchsatz.

3.3.5 Details zur Auswertung

BioConductor / R-Projekt

Mei et al. [0601] beschreiben BioConductor als kollaboratives offenes Projekt mit dem Ziel der Entwicklung eines in Modulen aufgebauten Rahmens für die Analyse von Datensätzen wie Microarray-Daten. BioConductor, in der Programmiersprache R verfasst, bietet einen Umfang an Modulen, die fast jeden Anwendungsanspruch bedienen können. Ein Nachteil ist vor allem die schwierige Benutzung, die eine umfangreiche Einarbeitung in die Programmiersprache R voraussetzt. Wie zuvor beschrieben, arbeiteten wir mit so kleinen Datenmengen, dass eine umfangreiche statistische Auswertung nicht nötig bzw. teilweise sogar unmöglich ist. Daher habe ich die Analyse mithilfe des BioConductor-System nicht in die grundlegende Auswertungsstrategie einbezogen, allerdings in speziellen Fällen, z.B. beim Test der Normalisierung über mehrere Slides nach Lowess, eingesetzt.

Konkordanzanalyse / Dye-Switch

In der Versuchsvorbereitung wurde die Konkordanzanalyse durchgeführt, um einen Hinweis auf die Datenqualität und –reproduzierbarkeit zu bekommen und zugleich mögliche *Dye-Switch*-Effekte zu erkennen.

Dafür wurde RNA aus einem Pool von Gehirn-totalRNA von fünf CD1-WT-Mäusemännchen in zwei Teilen mit jeweils einem der beiden Farbstoffe Cy3 (RNA-Menge 1) und Cy5 (RNA-Menge 2) transkribiert und die farbig markierte DNA hybridisiert. Dann wurde die Messung unter Tausch der Farbstoffe wiederholt.

Im Folgenden sind die Messergebnisse der Housekeeping Gene dargestellt.

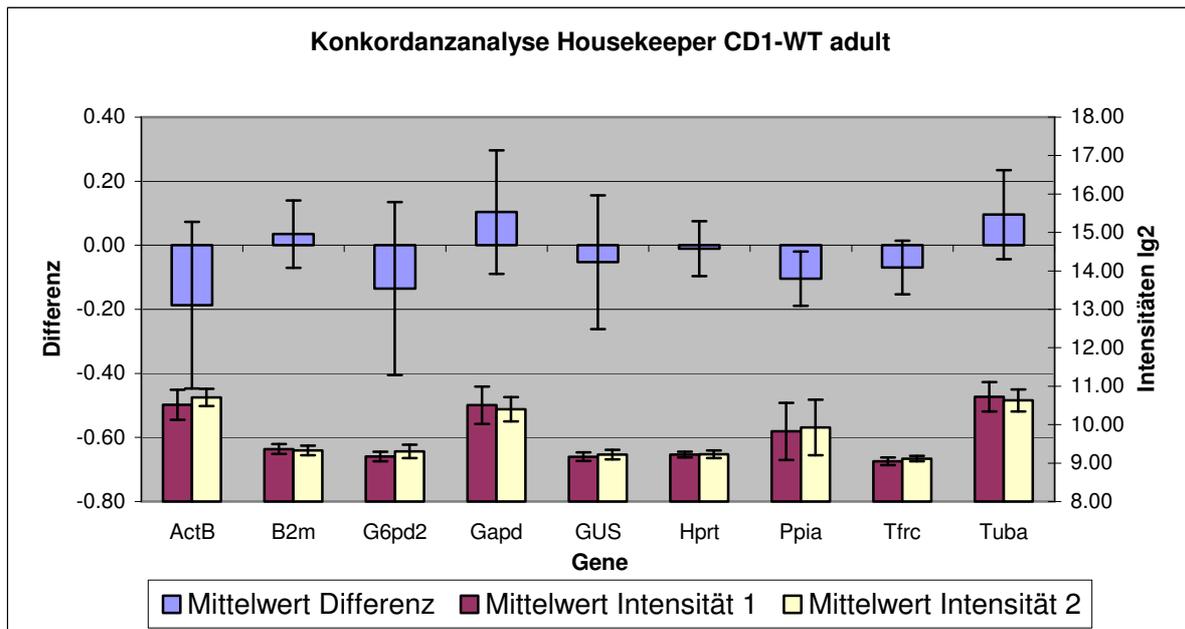


Abb. 3-22 Konkordanzanalyse,

Darstellung der Housekeeping Gene beim Vergleich zweier Proben desselben RNA-Pools; RNA-Menge 1 markiert mit Cy3 (Logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Die Abbildung zeigt die relativen Regulationen sowie die Intensitäten der Housekeeping Gene, welche beim ersten Experiment ermittelt wurden. Lediglich für β -Aktin (ActB) und G6pd2 tritt ein Differenzbetrag von über 0,1 als Down-Regulation (entsprechend einer geringeren Expression beim Knockout-Tier) auf. Bei beiden Genen zeigt sich dabei allerdings eine sehr hohe Standardabweichung, so dass die Abweichung schon im ersten Schritt als eher zweifelhaft zu betrachten ist. Die Auswertung des zweiten Experimentes nach *Dye-Switch* wird die ersten Messwerte relativieren. Abb. 3-23 zeigt die relativen Regulationen, die im zweiten Experiment ermittelt wurden.

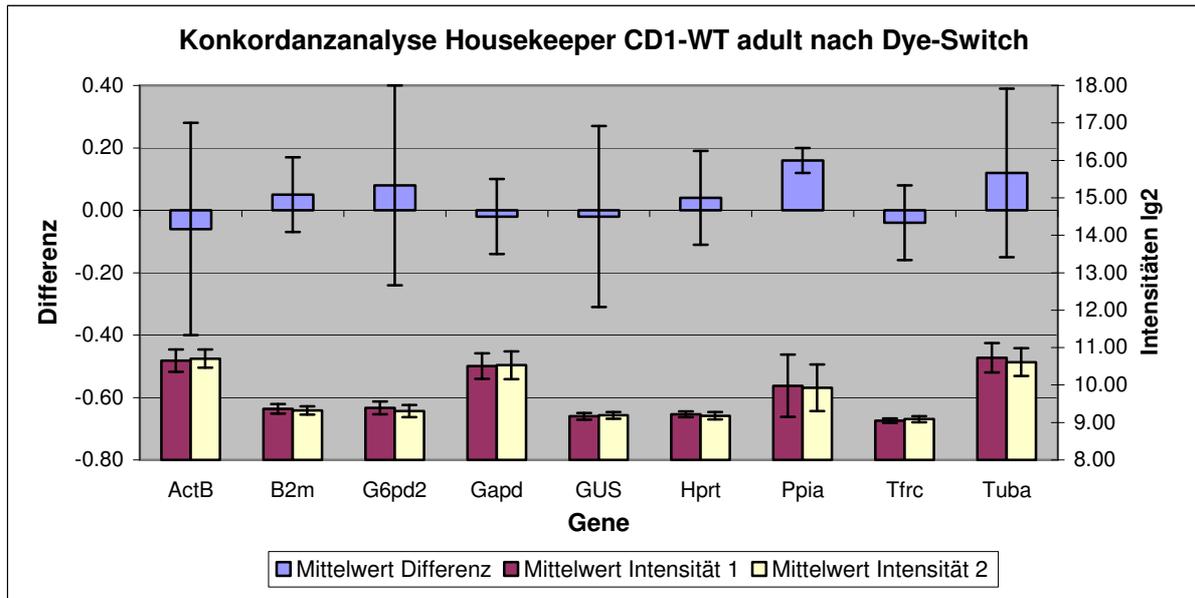


Abb. 3-23 Konkordanzanalyse

Darstellung der Housekeeping Gene beim Vergleich zweier Proben desselben RNA-Pools; RNA-Menge 2 gepoolt mit Cy3 (Logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

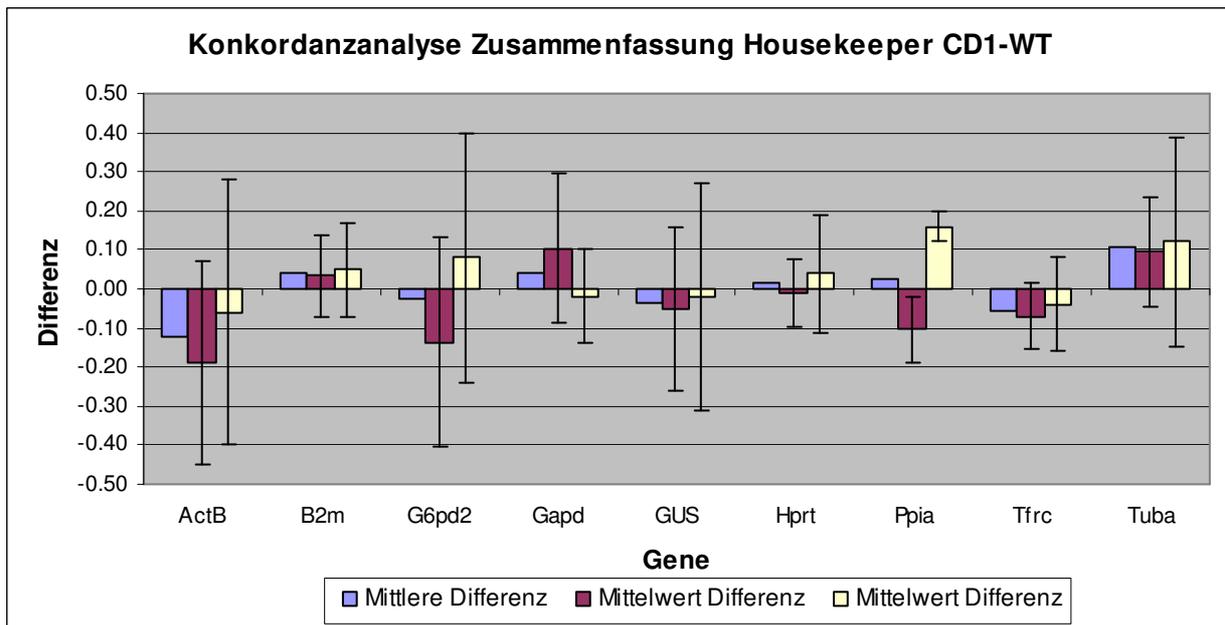


Abb. 3-24 Konkordanzanalyse

Zusammenfassung des Vergleichs zweier Proben desselben RNA-Pools (jeweils der Mittelwert der Differenz jedes Experimentes und der Mittelwert der Daten aus beiden Experimenten)

In Abb. 3-24 sind die beiden Experimente zusammengefasst. Verschiedenste Effekte, deren Abschätzung das Ziel der Konkordanzanalyse ist, können anhand der Housekeeper nachvollzogen werden:

- 1) Der typische *Dye-Switch*-Effekt ist vor allem bei Ppia und in gewissem Maße bei G6pd2 zu beobachten. Interessant bei diesem Effekt ist, dass hauptsächlich Gene davon betroffen sind, die nach einem ersten Experiment ohne *Dye-Switch* aufgrund niedriger Standardabweichung besonders gut zu sein scheinen. Erst das zweite Experiment, das den gegensätzlichen Regulationswert bei gleichfalls guter Standardabweichung liefert, zeigt, dass die gemessene Regulation auf einen Farbstoffeffekt zurückzuführen war, der abhängig von verschiedensten Faktoren aufgetreten ist. Auch in nachfolgenden Experimenten hat sich gezeigt, dass bei unseren Microarray-Versuchen ca. 10% aller Gene einem *Dye-Switch*-Effekt unterliegen.
- 2) Ein anderer Effekt ist ein scheinbarer Unterschied in der Genexpression, der sich bei beiden Experimenten wiederholt, dabei aber von einer relativ hohen Standardabweichung begleitet wird. Dieser Effekt führt also zu Regulationsdaten, die einer statistischen Datenanalyse nicht standhalten würden und zeigt sich in der obigen Abbildung bei α -Tubulin und β -Aktin.

Die restlichen Gene zeigen wie für die Konkordanzanalyse zu erwarten keine Regulation bei mehr oder weniger hoher Standardabweichung.

Im Resultat zeigt die Konkordanzanalyse wie im übrigen auch viele andere *Dye-Switch*-Versuche, bei denen keine Regulation der Housekeeping Gene aufgrund der Ähnlichkeit der Mausgruppen zu erwarten ist, dass ein durchschnittlicher Differenzbetrag von bis zu 0,1 als natürliche Schwankung anzusehen ist, während Werte über 0,1, die aus einem umfangreichen und stringent ausgewerteten Microarray-Versuch resultieren, auf bestehende Unterschiede in der Genexpression hinweisen. Dazu mehr im nächsten Absatz.

Filtergrenzen zur Ermittlung Regulierter Gene / Signifikanz-Berechnung

Wie im Kapitel „Datenanalyse“ bereits erwähnt, steht am Schluss der Auswertung die Berechnung der relativen Genexpressionen und die Ermittlung der Kandidaten für Gen-Regulation. Dieser letzte Schritt ist wiederum in großem Maße vom Versuchsdesign, der Array-Auswahl und der Auswertungsstrategie abhängig.

Da dieser Teil der Auswertung hinsichtlich der mathematisch-statistischen Prüfung der Ergebnisse die meisten Fragen aufwirft [0105], möchte ich nochmals auf das Problem „Signifikanz-Berechnung in Microarray-Daten“ eingehen.

Bei der abschließenden Datenanalyse haben sich im Wesentlichen zwei Methoden durchgesetzt: die Einzelfall-Filtration und die statistische Analyse.

Im Falle von kleinen Arrays mit wenigen Spots und einer überschaubaren Ergebnismenge werden üblicherweise willkürlich gesetzte Filtergrenzen für die Differenzbeträge festgelegt. Sie dienen hauptsächlich zur Abgrenzung von durch versuchstechnisch bedingten Schwankungen hervorgerufenen Fehlern und grenzen die Ergebnislisten auf wenige Gene ein, die dann weiter untersucht werden können. Die Auswahl der Filtergrenze erfolgt in Abhängigkeit von Vorversuchen, Standards und Kontrollen.

Unsere diversen Vorversuche haben gezeigt, dass bei Experimenten guter Qualität Differenzbeträge von bis zu 0,1 auf zufällige und systematische Fehler zurückzuführen sein können, Werte mit einem größerem Differenzbetrag aber unter Beachtung eines möglichen Dye-Effektes in den meisten Fällen auf Gen-Regulation zurückzuführen sind. Um noch einen gewissen Sicherheitsbetrag zu addieren, wird deshalb eine Filtergrenze von 0,2 für den Differenzbetrag angenommen.

Die andere Möglichkeit der Ergebnis-Ermittlung ist die statistische Auswertung unter Berechnung der signifikanten Unterschiede. Dabei werden die Datenmengen miteinander verglichen und die statistisch signifikant unterschiedlichen Gene näher betrachtet. Diese Form der Auswertung wird aufgrund der hohen Datenmengen vor allem bei großen Microarrays und bei Affymetrix-Daten durchgeführt. Auf der Basis der statistischen Auswertung (p-value, ratio) werden die Ergebnisse dann spezifisch analysiert. [0105].

Aus analytischer Sicht ist die zweite Methode natürlich klar zu bevorzugen. Allerdings geht es bei vielen Microarray-Messungen weniger um validierbare Ergebnisse als um das Sammeln einer Vielzahl von wichtigen Hinweisen und Kandidaten für die weitere Forschung. Die auf diesen Ergebnissen basierende Forschung muss dann entsprechend validierbare Ergebnisse liefern.

Unserem Versuchsziel entsprechend habe ich die Datensätze mit Hilfe der ersten Methode ausgewertet und bewertet. Die Ergebnisse liefern semi-quantitative Daten zur Genexpression aller untersuchten Gene.

3.3.6 Darstellung des Verlaufes einer Beispiel-Auswertung

Im Folgenden möchte ich anhand einiger Abbildungen den Verlauf einer Auswertung optisch darstellen. Dieser Slide wurde zum einen mit Cy3-markierter cDNA von neun Tage alten Jungtieren des CD1-Wildtyp-Stammes und zum anderen mit Cy5-markierter cDNA von adulten Tieren des gleichen Stammes hybridisiert.

Die erste Abbildung zeigt den GenePie, eine Darstellung der Spots entsprechend ihrer Position auf dem Slide als geteilte Kuchen mit einer roten und einer grünen Seite, die in ihrer Größe die Intensitäts-Verteilung widerspiegeln:

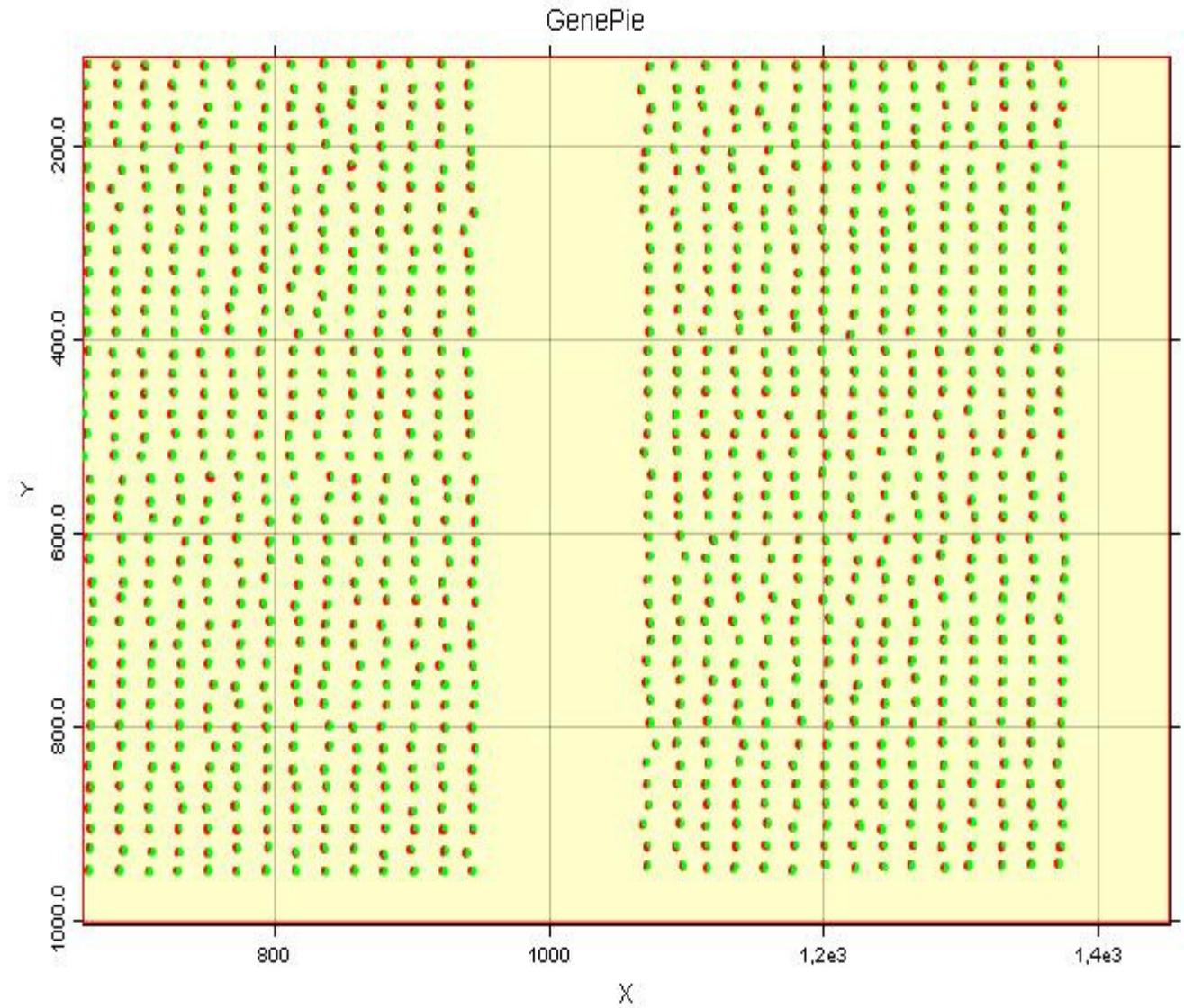


Abb. 3-25 GenePie von Slide 14,
unbehandelte Werte, direkt nach der Messung der Intensitäten

Die folgende Abbildung zeigt die gleichen Werte im Scatterplot aufgetragen mit der Intensität von Channel 1 (Laserfarbe) auf der x-Achse und Channel 2 (Laserfarbe) auf der y-Achse:

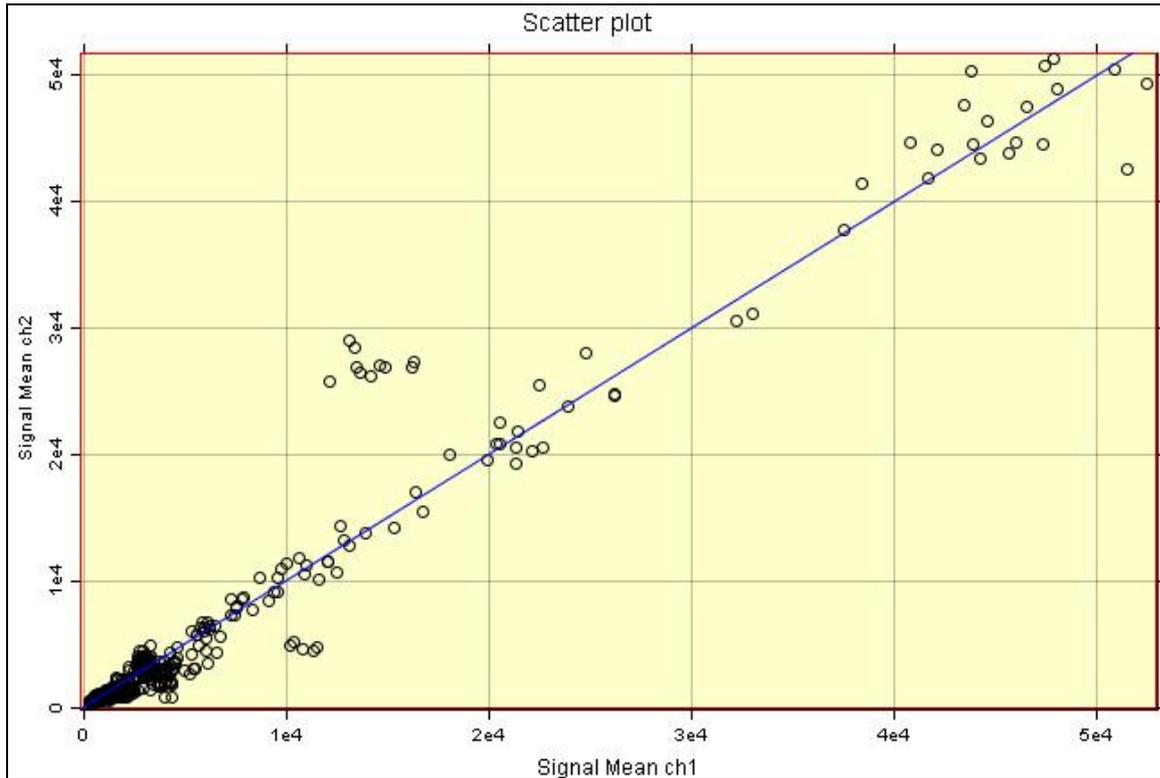


Abb. 3-26 Scatter-Plot S14, unbehandelte Werte

Nach der Logarithmierung zeigt sich folgendes Bild:

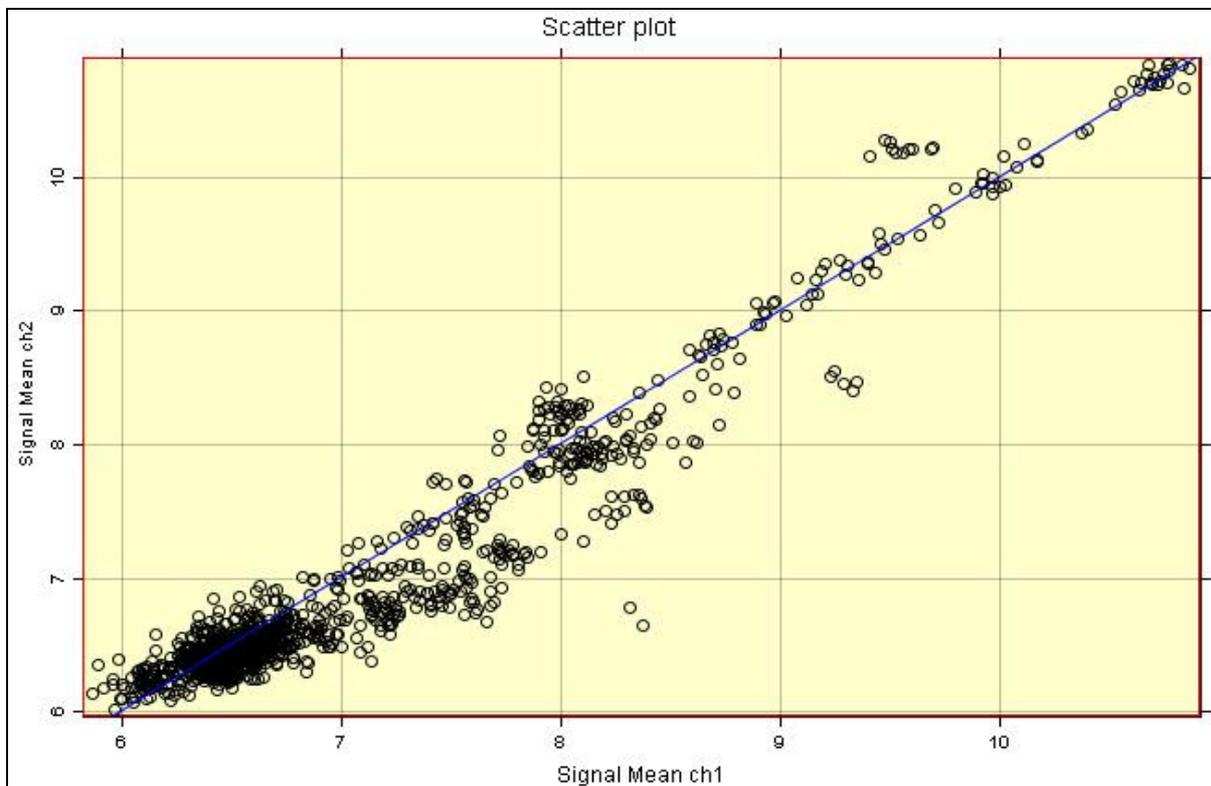


Abb. 3-27 Scatter-Plot S14, Werte logarithmiert zur Basis 2

Deutlich ist die Auffächerung der Werte zu erkennen, die auf der Transformation der Daten und der Entstehung einer Normalverteilung basiert. Die folgenden Darstellungen zeigen die Intensitäten eines Datensatzes im Histogramm: einmal unlogarithmiert und einmal logarithmiert zur Basis 2.

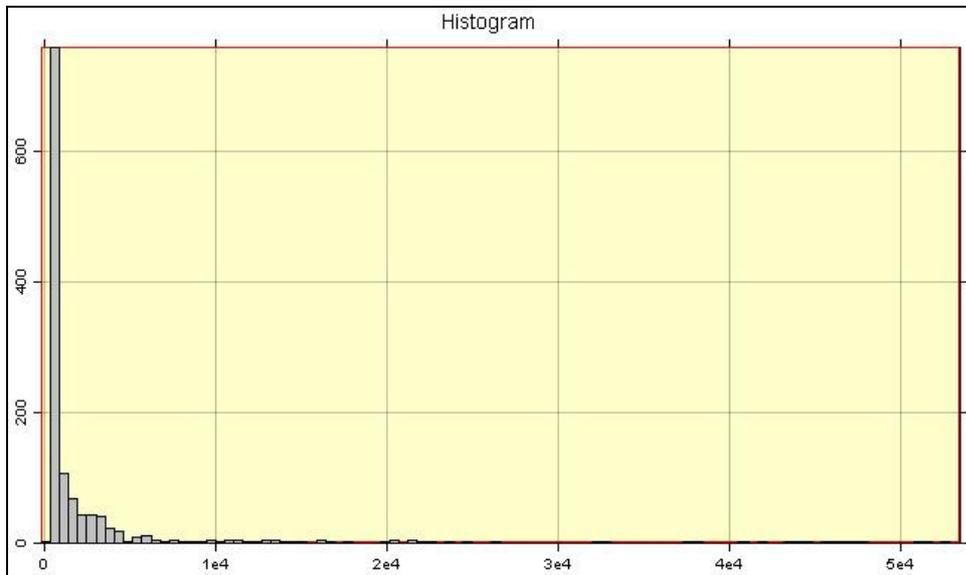


Abb. 3-28,
Scatter-Plot S14,
unbehandelte Werte
x-Achse: Intensitäten
y-Achse: Anzahl der Spots

Die gleiche Darstellung mit logarithmierten Werten:

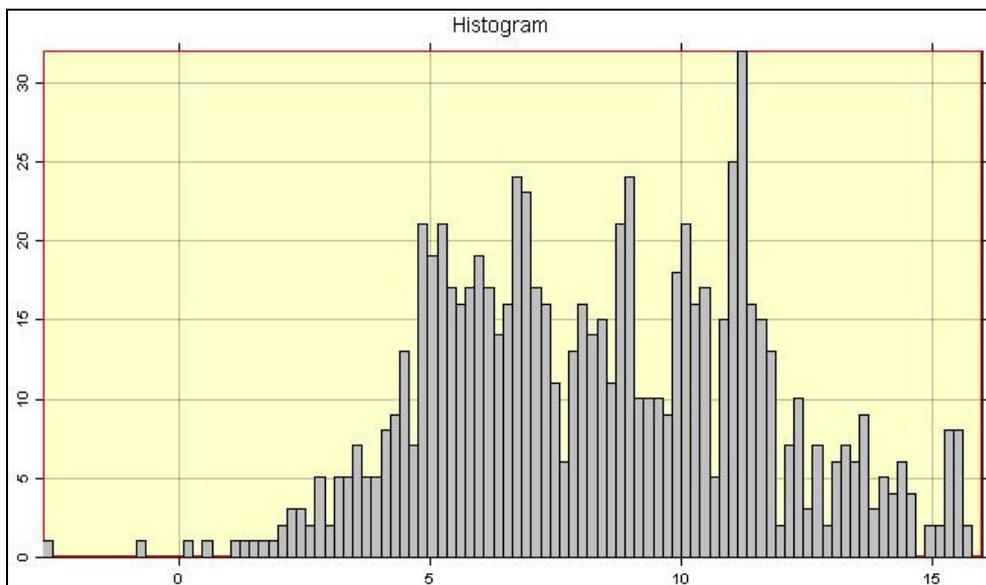


Abb. 3-29
Scatter-Plot S14,
Werte logarithmiert
zur Basis 2
x-Achse:
Intensitäten
y-Achse: Anzahl
der Spots

Das Verteilungsmuster der Werte ändert sich extrem. Es nähert sich der Normalverteilungskurve. Das ist Voraussetzung für die Durchführung einiger Normalisierungsmethoden, wie z.B. LOWESS.

Nach der Normalisierung der logarithmierten Daten zeigt sich folgendes Bild:

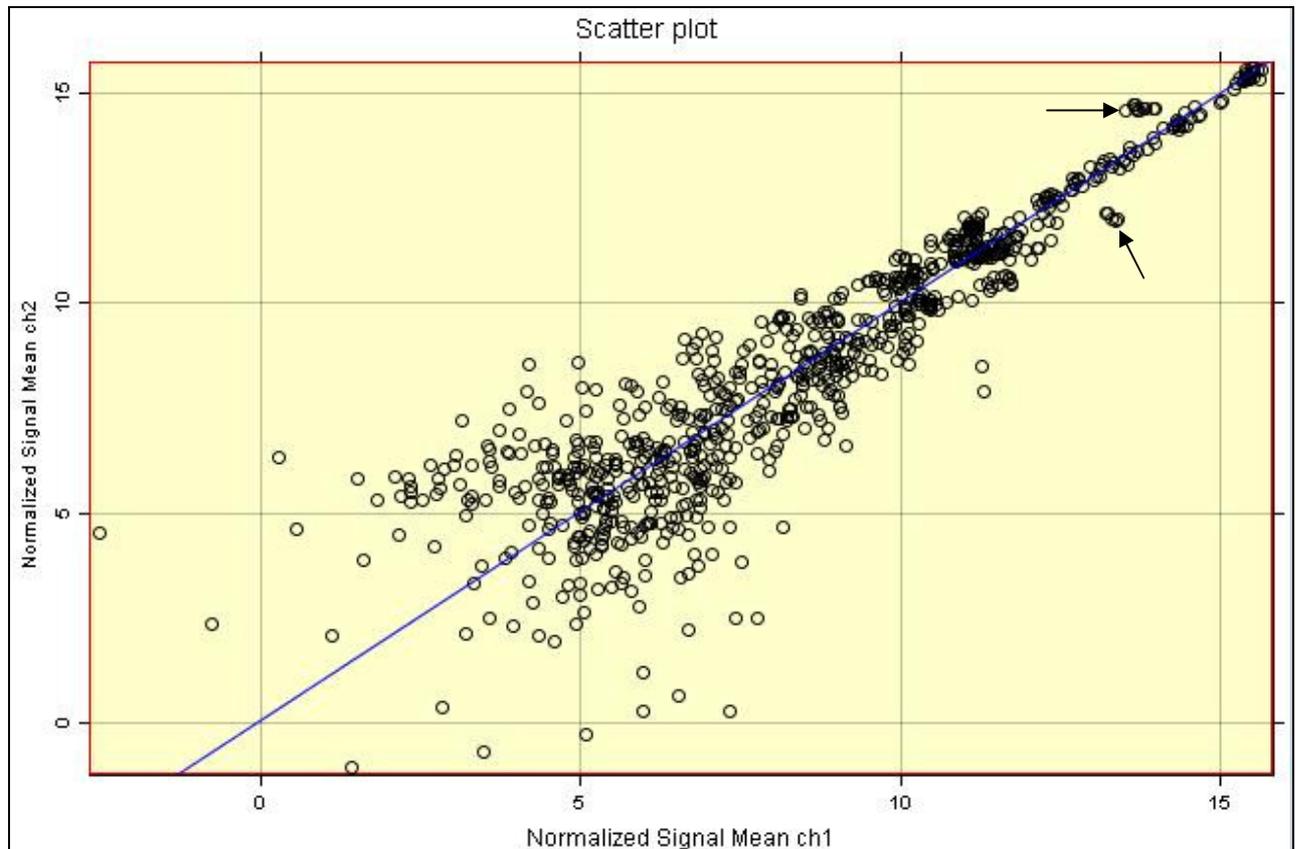


Abb. 3-30 Scatter-Plot S14,
Logarithmierung zur Basis 2
Normalisierung nach Lowess

Nach der Normalisierung werden die Werte im unteren Intensitätsbereich deutlich aufgefächert, während im Bereich der höheren Intensitäten eine Annäherung an die Regressionsgerade bei 1 eintritt. Dennoch lassen sich die kleinen Spot-Gruppen, auf die ich schon zuvor hingewiesen hatte, immer noch erkennen. Die Normalisierung führte also wie gewünscht zu einer Näherung an den „Ideal-Wert“, ließ dabei aber echte, bestehende Intensitätsunterschiede unangetastet.

Der Unterschied zwischen unbehandelten und den logarithmierten und normalisierten Werten lässt sich auch im MA-Plot (vergleiche Abb. 3-31 und Abb. 3-32) gut erkennen.

Je weiter die Datenpunkte von der Geraden bei Null entfernt sind, desto höher sind die betragsmäßige Abweichung und der Regulationswert.

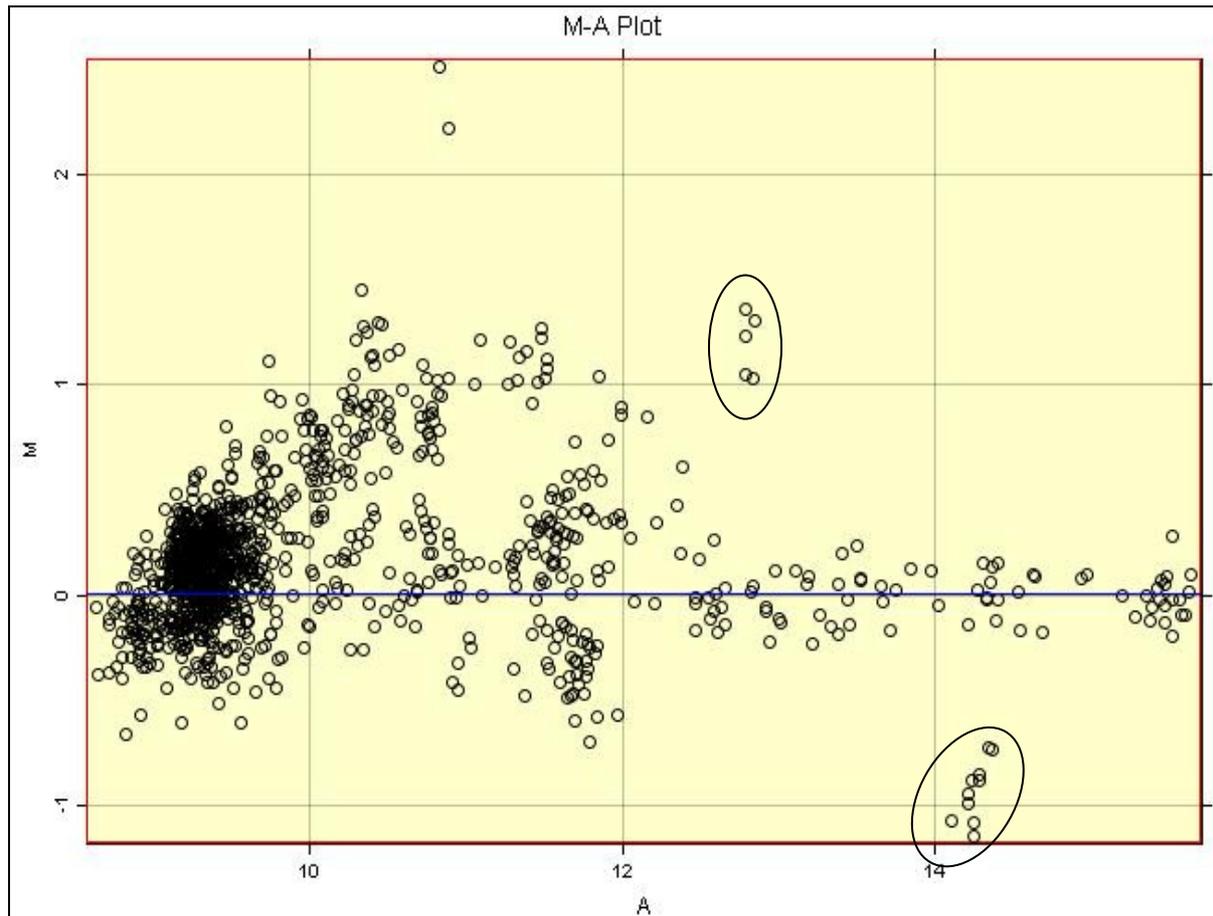


Abb. 3-31 MA-Plot S14,
Werte logarithmiert zur Basis 2
x-Achse: durchschnittliche Intensität \lg_2
y-Achse: *transformed Ratio*

Die Werte in Abb. 3-31 liegen mit deutlicher Tendenz im Bereich oberhalb der Gerade durch Null. Das lässt auf einen systematischen Fehler schließen, der zu Übergewichtung der Intensitäten eines Farbstoffes geführt hat (vgl. die vorhergehenden Abbildungen, vor allem der Scatterplots).

In der Darstellung des MA-Plottes gut zu erkennen sind die Veränderungen, die die Datentransformationen an Spotgruppen hervorrufen (siehe eingekreiste Spots). Durch die Normalisierung kommt es zu einer Zusammenlagerung der Spots durch die Näherungsberechnungen bei den Intensitäten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich im Laufe der Methodenentwicklung die eben beschriebene Strategie der Auswertung für unsere Datensätze entsprechend unserer Anwendung und unserem Auswertungsziel als am besten geeignet erwiesen hat.

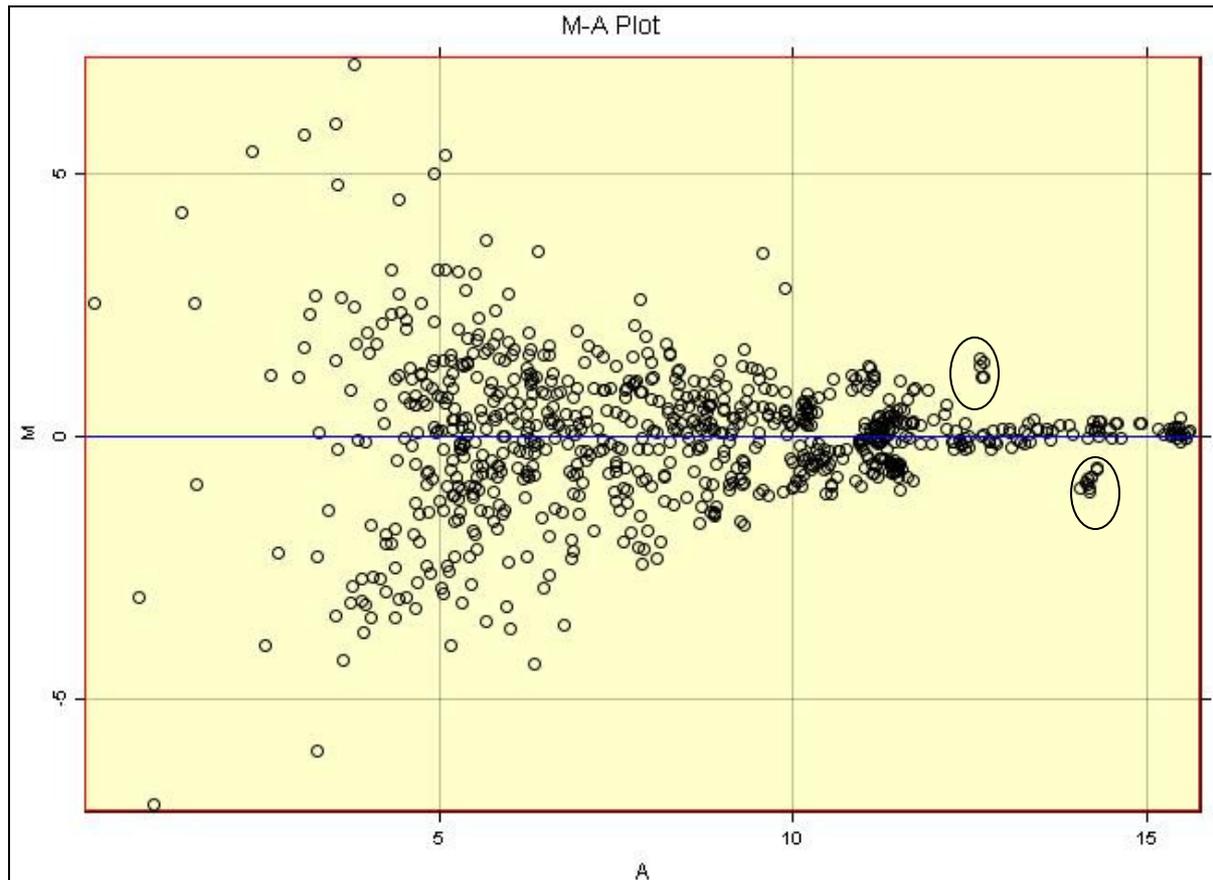


Abb. 3-32 MA-Plot S14,
Werte logarithmiert zur Basis 2,
normalisiert nach Lowess.
x-Achse: durchschnittliche Intensität \lg_2
y-Achse: *transformed Ratio*

3.3.7 Auswertung nach Wechsel in der Microarray-Charge

Die ersten Vorversuche und die grundlegenden Messungen, wie der Vergleich der Wildtyp-Mausstämme CD1 und C57/Black6 oder die vergleichenden Messungen bei den Gehirnarealen wurden mit der ersten Slide-Charge vom Oktober 2004 durchgeführt. Die zweite Charge wurde mit der gleichen DNA im März 2005 gespottet. Sie war hinsichtlich Spotverteilung, Slide-Oberfläche und Spotting-Verfahren völlig identisch zur ersten Charge.

Nach Abschluss der ersten TRESK-Experimente (Mäuse 153/162) war die Slide-Charge vom März 2005 aufgebraucht. Danach wurden Microarrays gespottet, deren Spots nicht mehr in Replikat-Reihen, sondern nach einer Art Kästchen-Formation angeordnet waren. Außerdem wurden neue weiterentwickelte Slides verwendet und das Spotting-Verfahren sowie die Hybridisierungsbedingungen umgestellt.

Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis eines Experimentes mit einem Slide aus der neuen Charge.

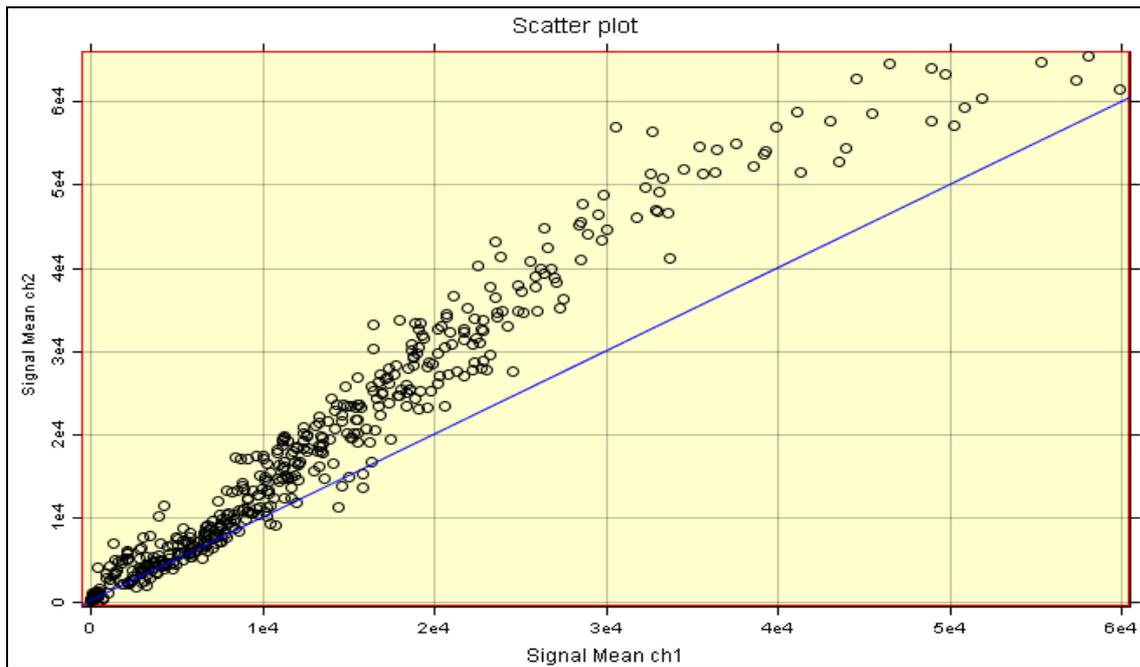


Abb. 3-33 Scatter-Plot S6,
unbehandelte Werte

Die Auswertung und Datentransformation erfolgte wie oben beschrieben. Nach Logarithmierung der Daten zur Basis 2 und Normalisierung nach Lowess zeigte sich folgender Scatterplot:

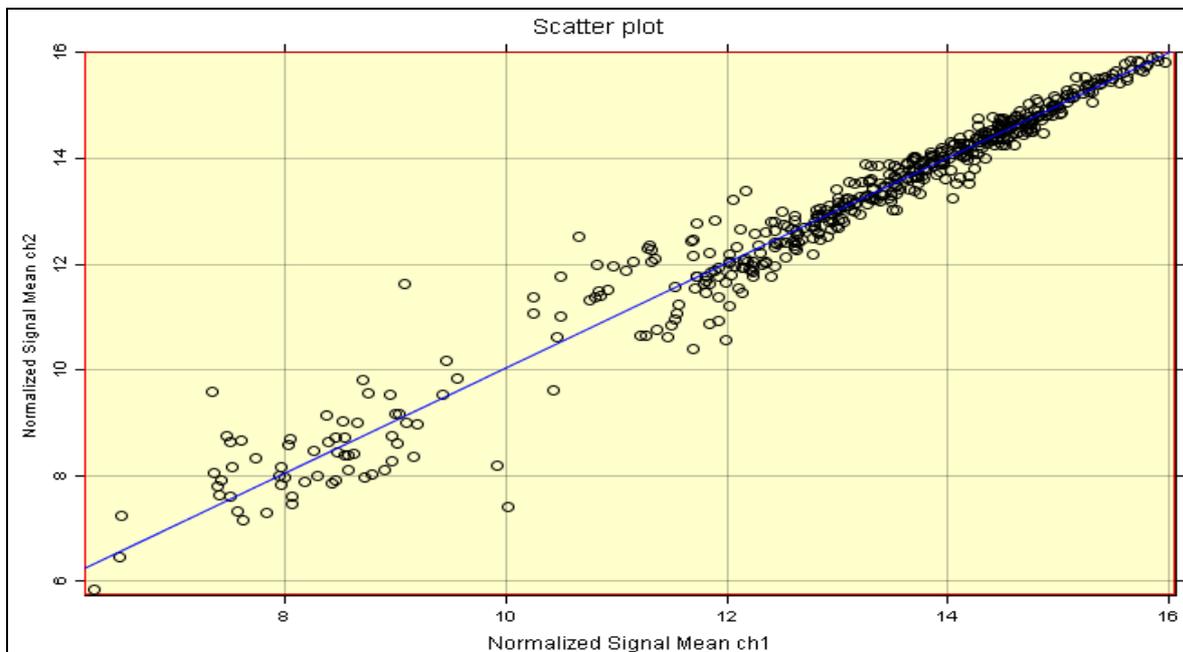


Abb. 3-34 Scatter-Plot S6,
Logarithmierung zur Basis 2,
Normalisierung nach Lowess

Sowohl in Abb. 3-34 als auch in Abb. 3-35 und im Histogramm der Intensitäten (Abb. 3-36) liegt im linken Bereich eine Gruppe von Punkten, die geringe Intensität aufweisen und sich von den restlichen Werten deutlich unterscheiden. Es handelt sich dabei um Hintergrund-Werte. In einigen Bereichen des Arrays waren keine DNA-Spots, sondern Spots, wo nur Printpuffer aufgebracht worden war. Diese Spots können als Hintergrundmessung herangezogen werden. Dieser Hintergrund stellt dann unter in Bezugnahme des Mittelwertes und der Standardabweichung der Printpuffer-Messwerte die Basis für eine Filterung der Daten hinsichtlich der Mindest-Intensität dar.

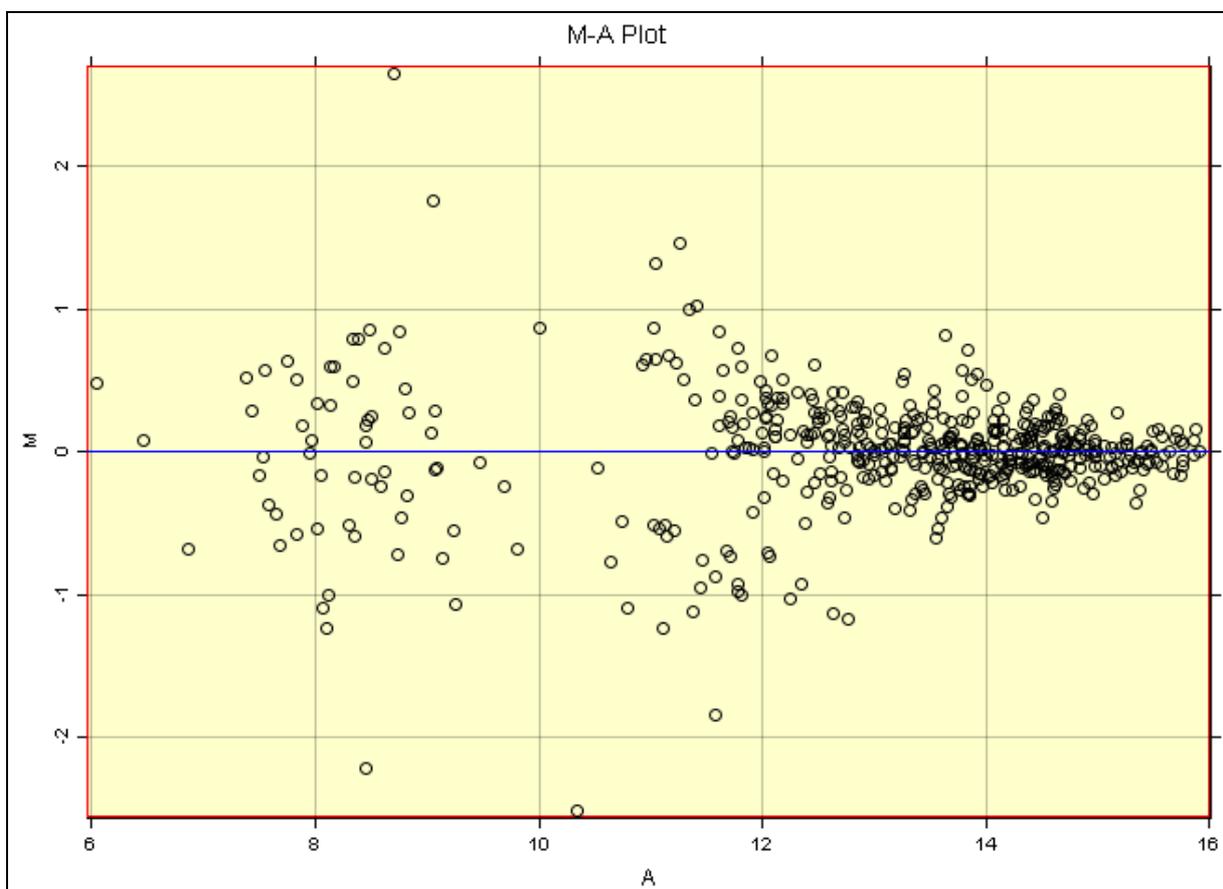


Abb. 3-35 M-A-Plot S6,
Logarithmierung zur Basis 2,
Normalisierung nach Lowess

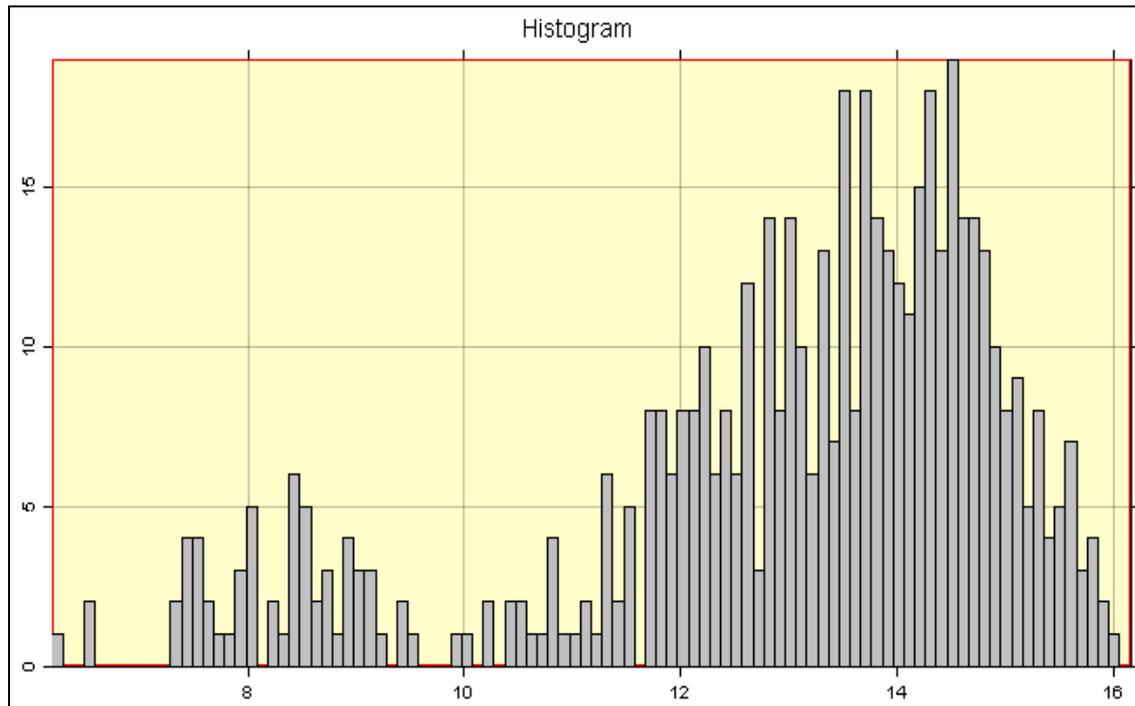


Abb. 3-36 Histogramm S6 Channel 1,
nach Logarithmierung zur Basis 2.

Wie aus den Abbildungen ersichtlich, zeigen sich für die Messwerte die gewünschten Verteilungen. Diese Slide-Charge ist also ohne Zweifel einsetzbar.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Messung der Gehirne der TRESK-Knockout-Tiere gegen ihren Wildtyp. Erst diese Messung würde im Vergleich zu den alten Messdaten die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Experimente bestätigen. Die Beschreibung der Messung und die Ergebnisse finden sich im Kapitel „Microarray-Analyse bei TRESK-Knockout-Mäusen“.

3.4 Material

3.4.1 Oligonukleotide (Primer)

Die für die PCR zur DNA-Gewinnung benötigten Primer wurden aus den entsprechenden cDNA- bzw. mRNA-Sequenzen ausgesucht (vgl. Anhang 3) und von Quiagen (später Operon) bezogen. Einige Primerpaare wurden durch neu ausgewählte Primerpaare ersetzt, wenn die PCR auch nach wiederholter Differenzierung der Bedingungen kein ansprechendes Ergebnis erbrachte.

3.4.2 Chemikalien / Solventien / Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Agarose | Biozym |
| Ammoniumacetat | Sigma, München |
| Ammoniumsulfat | Sigma-Aldrich, München |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich, München |
| AutoSeq G50 | Amersham Biosciences |
| Bernsteinsäureanhydrid | Sigma-Aldrich, München |
| Beta-Mercaptoethanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Chloroform | Roth GmbH, Karlsruhe |
| Chlorform/Isoamylalkohol (49:1) | Roth GmbH, Karlsruhe |
| dNTPs | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Sigma-Aldrich, München |
| Essigsäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ethanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, München |
| FluoroLink Cy3/Cy5-dCTP | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Formaldehydlösung 37% | Sigma-Aldrich, München |
| Formamid | Applied Biosystem, Darmstadt |
| Guanidiniumthiocyanat | Fluka, München |
| Isopropanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Luciferase RNA | Promega, Mannheim |
| MasterMix Taq | Quiagen, Hilden |
| (N-Morpholino)-Propansulfonsäure | Sigma-Aldrich, München |
| Natriumacetat | Sigma-Aldrich, München |
| Natriumcitrat | Sigma-Aldrich, München |

| | |
|--|-------------------------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich, München |
| Natrium-Sarcosyl | Merck, Darmstadt |
| Natronlauge (10 M NaOH) | Sigma-Aldrich, München |
| Nexterion Block E (4x) Puffer | Schott Nexterion, Mainz |
| Nona-Random-Primer | Operon (vorher Quiagen), Köln |
| Noxterion Spot (2x) Puffer | Schott Nexterion, Mainz |
| Oligo-dT-Primer | Operon (vorher Quiagen), Köln |
| QMT Blocking Solution | Quantifoil Micro Tools, Jena |
| Q-Solution | Quiagen, Hilden |
| RNaseOUT | Invitrogen, Karlsruhe |
| Roti-Phenol (wassergesättigtes Phenol) | Roth GmbH, Karlsruhe |
| Roti-Phenol/Chloroform | Roth GmbH, Karlsruhe |
| Salzsäure 32% (v/v) | Riedel-de-Haen, Seelze |
| SDS | Serva, Heidelberg |
| Superscript II Reserve Transkriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| T4 DNA-Ligase (400U/μl) | Biolabs GmbH, Frankfurt |
| Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) | Quiagen, Hilden |
| Tris | |

3.4.3 Geräte / Kits

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Laborwaage Laboritoris | Sartorius, Göttingen |
| Feinwaage BP211D | Sartorius, Göttingen |
| GenPak Spotter | GenPak, Genetix, München |
| Lucidea SlidePro Hybridization | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Mikrowelle | Daewoo, Butzbach |
| Nexterion Slide E | Schott Nexterion, Mainz |
| ScanArray 4000 | Perkin Elmer, Überlingen |
| T3-Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| Zentrifuge JC2N | Beckmann, Krefeld |
| QIAquick PCR-Reinigungs Kit | Quiagen, Hilden |
| QIAEX I Agarosegel-Extraktions Kit | Quiagen, Hilden |
| QIAEX II Agarosegel-Extraktions Kit | Quiagen, Hilden |
| RNeasy Mini Kit | Quiagen, Hilden |
| TA-Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe |

3.4.4 Software / Links

DNAStar Softwarepaket

DNAStar, Inc., Madison, WI

ImaGene 6.0

BioDiscovery, Inc., El Segundo, CA

ScanArray 4000

Perkin Elmer, Überlingen

BLAST, Sequenzrecherche

www.ncbi.nlm.nih.gov

BLAT

www.genome.ucsc.edu

Jackson Laboratory

www.jax.org

R-Projekt

www.bioconductor.org

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 PCR

Die DNA, die zum Spotten eingesetzt werden sollte, wurde über die Polymerasekettenreaktion gewonnen. Als Matrize wurde totalRNA aus Mausgehirnen des C57/Black6-Wildtypstammes, welche durch reverse Transkription in DNA umgesetzt worden war (vgl. Kapitel 6.2.2), und genomische DNA vom gleichen Mausstamm eingesetzt.

PCR mit MasterMix (Quiagen)

Für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion wurde eine fertig gemischt Reaktionslösung eingesetzt: MasterMix[®] (2fach, Quiagen). Für einen 20 µl – PCR-Ansatz wurde eingesetzt:

| | |
|----------|------------------------------|
| 10 µl | MasterMix |
| 1,6 µl | PrimerMix |
| x µl | Template (ca. 50-100 ng DNA) |
| ad 20 µl | Aqua bidest. |

Beim PrimerMix handelte es sich um eine Stocklösung aus 1 Teil Primer A (25 µg/ml), 1 Teil Primer B (25 µg/ml) und 2 Teilen Aqua bidest. Die Verwendung reduziert das Auftreten von Pipettierfehlern beim Pipettieren sehr kleiner Mengen.

PCR mit MasterMix und Q-Solution

Alternativ wurde zusätzlich Q-Solution eingesetzt, da sie in manchen Fällen den Erfolg der PCR günstig beeinflusst:

| | |
|----------|------------------------------|
| 10 µl | MasterMix |
| 4 µl | Q-Solution |
| 1,6 µl | PrimerMix |
| x µl | Template (ca. 50-100 ng DNA) |
| ad 20 µl | Aqua bidest. |

Folgendes PCR-Protokoll wurde durchgeführt (Annealing Temperatur 56-64°C):

| | | |
|------------|--------------|------------------|
| Schritt 1. | 94°C | 4 Minuten |
| Schritt 2. | 94°C | 1 Minute |
| Schritt 3. | Anealling T. | 30 – 90 Sekunden |
| Schritt 4. | 72 °C | 1 Minute |

Wiederholung Schritt 2. – 4.: 35 mal

| | | |
|------------|------|------------------|
| Schritt 5. | 72°C | 7 Minuten |
| Schritt 6. | 4°C | bis zur Entnahme |

3.5.2 Reverse Transkription

Für das Umschreiben der mRNA in DNA wurde ungefähr 1µg der totalRNA in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Im ersten Schritt wurden dazu 1 µl oligo-dT-Primer (5 µg/µl) und soviel DEPC-Wasser hinzugefügt, dass ein Gesamtvolumen von 15,5 µl erreicht wurde. Die Lösung wurde gemischt und bei 70°C 10 Minuten im Thermoblock inkubiert. Danach wurde die Mischung sofort für eine Minute auf Eis gelagert und anschließend folgende Lösungen hinzu pipettiert:

| | |
|--------|------------------------------------|
| 2,5 µl | 10x-Puffer (PCR-Puffer, Quiagen) |
| 2,5 µl | MgCl ₂ (25 mM, Quiagen) |
| 1 µl | dNTPs (Roche) |
| 2,5 µl | DTT (0,1 M, Quiagen) |

Nach dem Mischen wurde die Lösung im Thermoblock bei 42°C für eine Minute vorgewärmt, bevor 1 µl Superscript II hinzu pipettiert wurde. Nach weiterem Mischen wurde der Ansatz im Thermoblock bei 42°C für 50 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 70°C für 15 Minuten beendet. Die fertige DNA wurde sofort weiterverarbeitet oder aber bei -20°C bis zu einigen Monaten gelagert.

3.5.3 Isolierung von totalRNA aus Gewebe

Präparation von Gewebe

Die Tiere wurden zur Gewebe- und Organentnahme durch Genickbruch getötet und die gewünschten Gewebe entnommen. Nach der Entnahme wurde das Gewebe in sterile, RNase-freie Falcon-Gefäße (bei sofortiger Weiterverarbeitung) oder 1,5ml-Eppendorf-Gefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dies verhindert die kurz nach dem Tod des Tieres in den Geweben einsetzende Aktivierung der endogenen RNasen. Die längerfristige Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C.

Isolierung der totalRNA

Zur RNA-Gewinnung aus den von uns verwendeten Geweben Gehirn, Herz, Rückenmark und Spinalganglien wurde von uns ein Verfahren eingesetzt, dass sich stark an der 1987 von Chomczynski und Sacchi etablierten Methode orientiert [8701]. Das Verfahren basiert auf der Verwendung von stark denaturierenden Substanzen mit darauffolgender Abtrennung und Fällung der RNA.

- Das gefrorene Gewebe wurde dazu in ein 14ml-Falcon-Röhrchen eingewogen (max. 600mg) und dann mit 1ml /100mg Gewebe an Denaturierungslösung versetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA Labortechnik T25basic) ca. 60 Sekunden unter bis zum Maximum steigender Drehzahl (Leerlaufdrehzahl: 24000 min^{-1}) homogenisiert.
- Nach der Homogenisierung wurde das Falcon-Gefäß für ca. 5 Minuten auf Eis gestellt, damit der sich beim Homogenisieren gebildete Schaum absetzen konnte. Dann wurde die Suspension sowie ein Teil des Schaums auf mehrere 2ml-Eppendorf-Gefäße verteilt. Bei diesem Schritt erfolgte auch die Poolbildung, falls gleichzeitig mehrere äquivalente Gewebe aufgearbeitet wurden, von denen ein RNA-Pool erwünscht war. Dabei wurden max. 800 μl Suspension in jedem Gefäß vorgelegt, bei einem Pool war die anteilige Menge von der Anzahl der eingebrachten Tiere abhängig (z.B. 120 μl pro Tier, bei 6 Tieren).
- Zu der vorgelegten Suspension wurde im Folgenden, pro 100 mg Gewebe, zugesetzt:

| | |
|-------------------|---|
| 100 μl | 2M NaAc, pH4 |
| 1 ml | wassergesättigtes Phenol |
| 200 μl | Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (49:1). |

Das Eppendorf-Gefäß wurde nach erfolgter Zugabe der Reagenzien stark sowie regelmäßig danach leicht für 30 Sekunden geschüttelt und gemischt (Vortex). Folgende Schritte schlossen sich an:

- Inkubation auf Eis: 15 Minuten.
- Zentrifugation (Heraeus, Biofuge fresco): 20 Minuten bei 4°C und 10.000 U/min.. Abnehmen der oberen wässrigen Phase. Fällung der RNA durch Zusatz des zweifachen Volumenanteils an eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C .
- Zentrifugation: 35 Minuten bei 4°C und 10.000 U/min. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Überstandes wurde das Sediment in 250 μl Denaturierungslösung aufgenommen, gelöst und dann mit 1500 μl absolutem Ethanol erneut über Nacht gefällt.
- Zentrifugation: 35 Minuten bei 4°C und 10.000 U/min. Nach zwei Waschschritten mit 70%-igem Ethanol (500 μl und 300 μl) wurde das Präzipitat ca. 5 Minuten getrocknet (Savant, SpeedVac SC110) und letztendlich je nach Pelletgröße und Löslichkeit in 40 – 100 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Eine Lagerung der Proben bei 4°C über Nacht verbesserte die Löslichkeit deutlich.

- Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch, Qualität und Quantität der RNA mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmt. Nach Abschluss der Kontrollen wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

| | |
|----------------------|--------------------------------|
| Denaturierungslösung | 4 M Guanidinium-Thiocyanat |
| | 25 mM Natriumcitrat pH7 |
| | 0,5 % Na-Sarcosyl |
| | 0,1 M β -Mercaptoethanol |

Die Denaturierungslösung wurde entsprechend der benötigten Menge frisch hergestellt. Die 5%ige Na-Sarcosyl-Stammlösung, sowie die Natriumcitratlösung wurden nach der Herstellung mit DEPC-Wasser zusätzlich nochmals autoklaviert. Die Lösung wurde in zuvor ausgebackenen Flaschen angesetzt. Die Zugabe des β -Mercaptoethanols erfolgte erst kurz vor der Verwendung der Lösung. Die Lösung kann bei luftdichtverschlossener Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 2-3 Tagen verwendet werden.

Vor der weiteren Verwendung der totalRNA zur Durchführung von Microarray-Experimenten hat sich die Reinigung mit dem „RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup“ (Quiagen) als günstig erwiesen. Die mit so aufgereinigter RNA durchgeführten Experimente zeigten qualitativ höherwertige Microarray-Bilder mit weniger Hintergrund.

3.5.4 Kontrolle isolierter Nukleinsäuren

Qualität und Quantifizierung

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch (Pharmacia, GeneQuant pro, RNA/DNA Calculator) ermittelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm stellt ein direktes Maß für die Menge der gelösten Nukleinsäuren dar. So entspricht die Absorption von 1, gemessen bei 260 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm, $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ RNA bzw. einzelsträngiger DNA und $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Um eine ausreichende Genauigkeit zu gewährleisten, sollten die gemessenen Absorptionswerte im Bereich von 0,1-1,0 liegen. Die RNA- bzw. DNA-Isolate sind entsprechend je nach zu erwartender Konzentration zu verdünnen. Meist erfolgen Messungen bei Verdünnungen zwischen 1:10 bis 1:100.

Zusätzlich erfolgen die Messungen auch bei Wellenlängen von 280 nm und bei RNA auch bei 320 nm, um Aufschluss über die Reinheit der Isolate zu gewinnen. Über die Absorption bei 280 nm werden die Kontaminationen mit Phenol und Proteinen erfasst. Positive Absorptionswerte bei 320 nm sind ein Maß für die Verunreinigung mit Salzrückständen.

Gelelektrophorese von RNA-Proben

Die Gelherstellung erfolgte möglichst RNase-frei. Es wurden 0,6 g analytische Agarose eingewogen, in 30 ml Aqua bidest. aufgenommen, in der Mikrowelle unter Aufkochen gelöst und im Wasserbad bei 60 °C etwas abgekühlt. Die 65 °C-warme Gelgrundlage wurde unter dem Abzug mit 8 ml 5fach MOPS (100 mM 3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 25 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, mit 10 M NaOH auf pH7,0 einstellen, lichtgeschützt aufbewahren) und 7 ml Formaldehydlösung 37% versetzt und dann schnell in den vorbereiteten Gelschlitten ausgegossen. Bei sehr empfindlicher RNA, wie aus Gewebe gewonnener RNA, wurden der Gelschlitten und der Kamm zuvor mit RNasen-Entferner-Lösung (RNASE ZAP, Ambion) gereinigt. Der RNA-Auftragepuffer, der aliquotiert in 200 µl – Mengen vorliegt, wurde mit 1 µl Ethidiumbromidlösung versetzt und davon jeweils 8 µl für jede Probe vorgelegt. Dann wurden je 1-3 µl der Proben zugesetzt, gemischt und 10-15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mithilfe der Fototechnik unter UV-Einstrahlung bei 355 nm.

Gelelektrophorese bei DNA

Die Herstellung erfolgte mit analytischer Agarose und TAE-Puffer in dem dem gewünschten Gel entsprechenden Verhältnis (für die bei der PCR genutzten 2%igen Gele: 0,8 g in 40 g TAE). Nach Aufkochen in der Mikrowelle wurde verdampftes Wasser mit Aqua bidest. ergänzt und das Gel bei 60 °C im Wasserbad etwas abgekühlt. In das gut handwarme Gel wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung gegeben und umgeschwenkt. Die sämige Lösung wurde direkt im Anschluss ohne Blasenbildung in den vorbereiteten Gelschlitten ausgegossen. Ein Aliquot bzw. die gesamte Menge der zu untersuchenden DNA wurde mit 5x-Probenpuffer versetzt und nach dem Mischen in die Geltaschen pipettiert. Je nach Fragmentlänge und Gelzusammensetzung wurde nach 30 – 60 Minuten bei 70 – 100 V eine Aufnahme des Gelbildes unter UV-Licht gemacht.

3.5.5 Linearisierung klonierter DNA

Gewinnung der GFP-RNA

10-15 µg klonierte DNA, d.h. „Vektor mit Insert“ – DANN, wurde mit dem geeigneten Puffer und dem für die Linearisierung gewünschten Enzym versetzt, hier XhoI, und der Ansatz auf 100 µl Endvolumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Dann wurde der Ansatz bei 37 °C 3 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Eppendorf-Gefäß auf Eis gelagert und zur Kontrolle des Verdaus eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Linearisierungsansatz

15 µl DNA (ca. 10 µg)

10 µl Puffer 2
2 µl Enzym Xho I
73 µl Aqua bidest.

In-vitro Transkription

Alle Schritte wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

- Die extrahierte DNA wurde mit 200 µl eines Phenol-Chloroform-Gemisches (1:1) versetzt. Nach Zentrifugation (13000 U/min, 5 Minuten) wurde der Überstand in ein neues, RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Die Phenolphase wurde mit 50 µl Aqua bidest. ein zweites Mal gewaschen und der Überstand zum ersten Überstand hinzugefügt. Um auch letzte Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurden die vereinigten Überstände mit 200 µl Chloroform gewaschen. Nach Zentrifugation (13.000 U/min., 5 Minuten) wurde der Überstand in ein neues, RNase-freies Gefäß überführt und das Volumen bestimmt. Anschließend wurde mit 1/10 Volumen 3M NaAc, pH5,2 und 2,5 faches Volumen an eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.
- Am folgenden Tag wurde 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Präzipitat wurde mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (13.000 U/min., 4 °C, 10 Minuten). Danach wurde der Überstand abgenommen, das Präzipitat getrocknet und in 25 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Mithilfe einer photometrischen Messung wurde die DNA-Konzentration ermittelt.
- Für den Transkriptionsansatz wurde das Template mit Nukleotiden, Puffer und Enzymen versetzt:

| | | |
|----------------------|---------|-----------------------------|
| Transkriptionsansatz | x µl | Template (ca. 3 µg) |
| | 20-x µl | DEPC-Wasser |
| | 5 µl | ATP (10 mM) |
| | 5 µl | CTP (10 mM) |
| | 5 µl | TTP (10 mM) |
| | 5 µl | GTP (10 mM) |
| | 5 µl | 10fach Transkriptionspuffer |
| | 2,5 µl | RNase-Inhibitor (Böhringer) |
| | 2,5 µl | T7-RNA-Polymerase |

- Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, dann mit 5 µl DNase versetzt und weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform (1:1) abgebrochen. Nach Mischen (Vortex) und Zentrifugation (13.000 U/min, 5 Minuten) wurde der Überstand in ein neues RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Die Phenolphase wurde mit 50 µl DEPC-Wasser gewaschen und der Überstand dem ersten Überstand hinzugefügt. Diese Lösung wurde mit 200 µl Chloroform gemischt und wiederum 5 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, RNase-freies Gefäß überführt und das Volumen bestimmt. Dann wurde mit 1/10 Volumen 3M NaAc, pH5,2 und 2,5fachem Volumen an eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.
- Am folgenden Tag wurde 30 Minuten bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Präzipitat wurde mit 200 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Qualität und Quantität des Produktes wurden mithilfe der Gelelektrophorese überprüft.

Gewinnung der Saccharomyces-Kontroll-RNA

Als Ausgangspunkt dienten die auf ampicillinhaltige Agarose-Platten ausgebrachten E.coli-Stämme „psacch 1, psacch 2, psacch 3 und psacch 5“. Dabei handelte es sich um ampicillinresistente Stämme mit pcDNA3-Vektoren, denen folgende Saccharomyces-Gene eingesetzt wurden:

psacch1: CHS1 (1kbp)

psacch2: GAS1 (1kbp)

psacch3: FKS1 (550bp)

psacch5: CHS2 (1kbp)

- Von jeder Platte wurden 2 Kolonien gepickt und in 3 ml ampicillinhaltiges Kulturmedium eingebracht. Über einen Zeitraum von sieben Stunden bei 37 °C im Schüttelbrutschrank wuchsen die Bakterien bis eine deutliche Trübung des Kulturmediums erreicht war. Dann wurden 500 µl der Kultursuspension in eine ampicillinhaltige 50 ml-Arbeitskultur überführt und die Arbeitskulturen über Nacht bei 37 °C im Schüttelbrutschrank inkubiert.

Außerdem wurden 850 µl der Vorkultur dazu genutzt einen Glycerolstock von den vier Bakterienstämmen aufzubauen. Dafür wurden die 850 µl Kultursuspension mit 150 µl

Glycerol versetzt, das Gemisch gemischt (Vortex) und dann in einem Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren.

- Die Arbeitskultur wurde am nächsten Tag mit Hilfe des „Quiagen Plasmid Midi Kits“ aufgearbeitet. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen.
- Für die darauf folgende Linearisierung mit XhoI wurden jeweils 10 µg Plasmid-DNA verwendet. Sowohl hinsichtlich der Linearisierungsbedingungen und der Aufarbeitung des Linearisierungsansatzes als auch in Bezug auf die *In-vitro*-Transkription und die darauf folgende Aufarbeitung wurde die gleiche Methode angewendet wie oben für die Gewinnung der GFP-RNA beschrieben.
- Im Anschluss daran erfolgte hier aber noch ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit dem „Quiagen RNeasy-Mini-Kit“. Nach einer positiven Qualitätskontrolle per Gelelektrophorese wurden die vier RNA-Ansätze für den späteren Einsatz als Kontroll-RNA für die Microarray-Versuche nach folgendem Schema gemischt:

| | „Cy3“ | „Cy5“ |
|---------|---------|---------|
| psacch1 | 3 Teile | 1 Teil |
| psacch2 | 2 Teile | 2 Teile |
| psacch3 | 2 Teile | 2 Teile |
| psacch5 | 1 Teil | 3 Teile |

Die dadurch eingestellten Mengenverhältnisse sollten durch die Messergebnisse bei der Microarray-Messung wiedergegeben werden und so als Kontrolle der Farbenverhältnisse dienen.

Die gemischte Kontroll-RNA wurde aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

3.5.6 Methoden: Microarray-Experiment

Durchführung des Microarray-Experimentes vor Wechsel der Slide-Charge – Methode 1

Für den Microarray-Versuch wurde mRNA in cDNA umgeschrieben und im gleichen Schritt erfolgt eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen.

- Die gewünschte Menge an totalRNA wurde durch Fällern, Trocknen und Aufnehmen in DEPC-Wasser auf ein Volumen von 13 µl eingestellt.

- Zugesezt wurden jeweils 1 μl der drei Kontroll-RNA-Lösungen (GFP-, Luciferase- und Saccharomyces-RNA) bzw. es wurden 3 μl eines aus gleichen Teilen der drei Kontroll-RNA-Lösungen hergestellten Kontrollen-Mixes zur totalRNA pipettiert.

Das hat mehrere Voreile. Zum einen, dass die zu pipettierende Menge größer ist und damit der Pipettierfehler geringer und zum anderen, dass die Menge an angesetzter Kontroll-RNA und die spezifischen Verhältnisse zueinander über viele Microarray-Versuche gleich bleibt und die Kontrollen so besser zur Auswertung herangezogen werden können.

- Zugesezt wurden weiterhin ein oligo-dT-Primer und Nona-Random-Primer. Die Primer wurden nach ihrer Lieferung als Lyophilisat in soviel DEPC-Wasser gelöst, dass eine Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestand. Für den Versuch wurden 2,5 μg oligo-dT-Primer und 2 μg Nona-Random-Primer eingesetzt. Die Mischung aus RNA und Primern wurde 10 Minuten lang im Thermoblock auf 70 °C erwärmt und dann sofort auf Eis gestellt.
- Während der Inkubationszeit der RNA-/Primer-Mischung wurde der MasterMix vorbereitet.

| | | |
|---|------------------------|--------------------|
| Für 4 Proben (2 Slides) wurden verwendet: | dCTP (10 mM) | 3,2 μl |
| | dATP (20 mM) | 4 μl |
| | dGTP (20 mM) | 4 μl |
| | dTTP (20 mM) | 4 μl |
| | DTT 0,1 M | 9,6 μl |
| | DEPC-Wasser | 15,2 μl |
| | 5x First Strand Buffer | 32 μl |
| | RNaseOut | 4 μl |

Der MasterMix wurde nach gründlichem Mischen (Vortex) auf zwei RNase-freie Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und im Folgenden entweder mit roter (Cy3) oder blauer (Cy5) Fluoreszenz-Farbstoff-gelinkter CTP-Lösung versetzt.

Ab diesem Zeitpunkt ist beim Arbeiten mit den Farbstoffen auf Abdunklung des Raumes und schnelles Arbeiten zu achten.

- Nach Abkühlung der RNA-/Primer-Mischung auf Eis wurden in jede Probe entsprechend dem Versuchsplan 21 μl des roten oder blauen MasterMixes pipettiert.
- Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur (5 Minuten, zur Anlagerung der Primer)
- Nach einer 1-minütigen Erwärmung im Thermoblock auf 42 °C wurden die warmen Proben mit jeweils 2 μl SuperScriptII versetzt und erneut gemischt.
- Inkubation bei 42 °C für 2,5 Stunden.

- Erhitzung auf 70 °C für 15 Minuten mit sofortiger Abkühlung im Eis.
- Die abgekühlten Proben wurden mit 2 µl RNase, DNase-free, versetzt und 45 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Zeit während der Inkubation der Proben im Brutschrank kann zur Prähybridisierung der Slides genutzt werden:

- Dafür wurden die Slides zuerst 15 Minuten mit der „Amino Blocking Solution“ bei Raumtemperatur behandelt. Zusammensetzung der Lösung:
3,6 g Bernsteinsäureanhydrid,
225 ml N-Methylpyrrolidon
25 ml 0,2 M Natriumboratlösung pH8
- Nach dem Umsetzen der Slides in 0,1%iges SDS für 15 Sekunden sowie in reines Aqua bidest. für weitere 15 Sekunden erfolgte ein Kochvorgang bei mind. 95 °C warmen Aqua bidest, welches in der Mikrowelle zuvor auf diese Temperatur erhitzt wurde. Dafür blieben die Slides 3 Minuten im weiterhin kochenden Wasser (Mikrowelle Daewoo Stufe 1). Im Anschluss daran wurden die Slides mit Hilfe der Zentrifugation bei 1500 U/Min. für drei Minuten (Beckman JC2N) getrocknet und dann trocken und staubgeschützt bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Nach Vorbereitung der Slides erfolgt die abschließende Aufarbeitung der Proben:

- Die Reinigung der Proben erfolgte mit Hilfe von Säulen (AutoSeq G50, Amersham) nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll, wobei die cDNA-haltige Lösung in zwei Schritten auf die Säulen aufgetragen wurde, um eine Überladung und Verluste zu vermeiden.
- Dann wurden entsprechend dem Versuchsplan jeweils eine rote und eine blaue Probe vereinigt. Das Gesamtvolumen wurde durch Einrotieren in der Speed-Vac (Savant, SpeedVac SC110) bei halber Heizleistung und Vakuum reduziert.

Im Wesentlichen wurden zwei verschiedene Hybridisierungsverfahren eingesetzt, die sich nur hinsichtlich der Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers unterscheiden.

1. Das erste Verfahren kommt ohne den Zusatz von Formamid aus. Bei den vereinigten Proben wurde ein Zielvolumen von 22,5 µl eingestellt. Nach der Zugabe von 4,5 µl 20x SSC und 3 µl 1% SDS und guter Durchmischung erfolgte eine Erhitzung auf 95 °C im Thermoblock für eine Zeit von 3 Minuten. Typischerweise liegt die Hybridisierungstemperatur beim Formamid-freien Verfahren bei 55-65 °C, wobei wir bei ca. 60 °C hybridisierten, nachdem bei niedrigeren Temperaturen auch Kreuzhybridisierungen auftraten.

2. Beim zweiten Verfahren wurden die vereinigten Proben nach der Einstellung auf ca. 10 µl mit 15 µl Formamid, 4,5 µl 20x SSC und 0,8 µl 10% SDS versetzt und ebenfalls 3 Minuten im Thermoblock auf 95°C erhitzt. Bei Einsatz von Formamid wird im Folgenden bei 42°C hybridisiert im Wasserbad hybridisiert.

Durch das kurze, starke Erhitzen der Probe kommt es zur Aufspaltung der DNA in Einzelstränge. Nach den 3 Minuten bei 95°C sollte die Probe bei Raumtemperatur auf Handwärme abkühlen, da SDS bei Temperaturen unter 20 °C ausflockt, und deswegen eine Abkühlung auf Eis nicht empfehlenswert ist. Grund dafür ist die hohe Affinität der „SDS-Flocken“ zur Slideoberfläche und die hohe Lichtreflektion des SDS, wodurch beim Scannen des Slides ein extrem starker, leuchtender Hintergrund entsteht. Daher sollte die Probe vor dem Auftragen nochmals auf eine durch das SDS möglicherweise verursachte Trübung geprüft werden. Tritt eine Trübung auf, muss das SDS mittels Handwärme und Mischen (Vortex) in Lösung gebracht werden.

- Dann wurde die Lösung auf den prähybridisierten Slide ohne Berührung der Slide-Oberfläche aufpipettiert und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt.
- Der Slide wurde in eine Hybridisierungskammer (Corning) eingesetzt. Nach dem Pipettieren von Wasser in die entsprechenden Vertiefungen der Kammer und dem luftdichten Verschließen der Kammer, wurde diese in Alufolie verpackt und in das Wasserbad gelegt. Wichtig dabei war, die Kammer immer waagrecht zu halten und nicht zu drehen.
- Am nächsten Morgen (nach einer ungefähren Hybridisierungsdauer von 15-17 Stunden), wurde die Kammer aus dem Wasserbad genommen und der Slide gewaschen. Das Waschen erfolgte wiederum im Dunklen.

| | | |
|----------------|----------|------------------|
| Waschlösungen: | Lösung 1 | 2xSSC / 0,2% SDS |
| | Lösung 2 | 2x SSC |
| | Lösung 3 | 0,2x SSC |

Der Slide wurde mit Deckgläschen in die erste Waschlösung gestellt und dann das Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. In allen drei Waschlösungen wurde jeweils 15 Minuten gewaschen. Dazwischen darf der Slide nicht antrocknen. Zum Abschluss wurde der Slide bei 1500 U/min 3 Minuten trocken zentrifugiert.

Der trockene Slide kann dann in „Dye-Saver“ getaucht werden. Die Lösungsmittel im Dye-Saver überziehen die Oberfläche und schützen dadurch die Farbstoffe der hybridisierten DNA. Das kann nötig sein, weil die Farbstoffe nicht nur lichtempfindlich sind, sondern auch sehr empfindlich auf Oxidationsmittel und Luftbestandteile wie Ozon reagieren. Ohne diesen

Schutz ist vor allem der empfindlichere Farbstoff Cy5 nach einer Stunde bei Kontakt mit Luft nicht mehr nachweisbar. Erfolgt das Waschen und Scannen des Slides kurz hintereinander in einem Gebäude, dann kann man auf den Dye-Saver verzichten. Außerdem ist bei der Anwendung des Dye-Savers zu beachten, dass er eine Eigenfluoreszenz aufweist und deshalb nur sehr dünn aufgebracht werden darf. Mit zunehmendem Alter des Dye-Savers nimmt das Phänomen der Eigenfluoreszenz deutlich zu. Alternativ zur Anwendung des Dye-Savers bietet sich der Transport des Slides in luftdicht verschlossenen Gefäßen an. Hier besteht aber ein deutliches Zeitlimit zwischen Waschen und Scannen. Nachdem erste Versuche mit dem Dye-Saver unerwünschte Nebeneffekte erbrachten, wurde bei den eigentlichen Messungen auf den Dye-Saver verzichtet.

Durchführung des Microarray-Experimentes nach Wechsel der Slide-Charge – Methode 2

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, wurde nach der Messung von zwei Chargen ein Methodenwechsel durchgeführt, da neue, vom Hersteller verbesserte Slides und ein anderes Spottingverfahren zum Einsatz gekommen sind. Einige Schritte des Experimentes wurden deshalb umgestellt: das Prähybridisieren (Blocken) der Slides, teilweise das Hybridisieren und das Waschen.

Das Blocken erfolgte nach dem Protokoll: „Quantifol Blocking Process“. Dafür kommen neben Aqua bidest. folgende Lösungen zum Einsatz:

| Name | Zusammensetzung | Herstellung | Bemerkung |
|--------------------------|---|--|--|
| Lösung 1 | 0,1% Triton-X100 | 1ml Triton in 1000 ml H ₂ O | Zum Lösen Erwärmen auf 60°C im Wasserbad |
| Lösung 2 | HCl solution | 1ml 1N HCl in 1000 ml H ₂ O | |
| Lösung 3 | 100mM KCl | 100 ml KCl in 1000 ml H ₂ O | 1M KCl Stocklösung verwenden |
| 1x QMT Blocking Solution | Wie auf dem Etikett beschrieben H ₂ O und HCl zusetzen | | |

Zum Prähybridisieren wurden die Slides in Glasküvettenhaltern in Glasküvetten gestellt und nach folgendem Schema behandelt:

- 1 x 5 Min. in Lösung 1 bei Raumtemperatur
- 2 x 2 Min. in Lösung 2 bei Raumtemperatur
- 1 x 10 Min. in Lösung 3 bei Raumtemperatur
- 1 x 3 Min. in kochendem (95-100°C) Aqua bidest.
- 1 x 1 Min. in Aqua bidest. bei Raumtempatur

1 x 15 Min. in 1x QMT Blocking solution bei 50°C
(mind. 20 ml Lösung pro Slide)

1 x 1 Min. in Aqua bidest. bei Raumtemperatur

Im Anschluss daran wurden die Slides mit Hilfe der Zentrifugation bei 800 U/Min. für 5 Minuten (Beckmann JC2N) getrocknet und dann trocken und staubgeschützt bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Das Waschen erfolgte ähnlich wie bei der vorhergehenden Methode mit SDS- und SSC-haltigen Lösungen (vgl. Waschlösung 1-3). Dabei kam allerdings folgendes Schema zum Einsatz:

1 x 1 Min. in Waschlösung 1 (Entfernung des Deckgläschens)

1 x 10 Min. in Waschlösung 1

1 x 10 Min. in Waschlösung 2

1 x 10 Min. in Waschlösung 3

Nach dem Waschen erfolgte die Trocknung der Slides durch Zentrifugation bei 1500 U/Min. für 3 Minuten. Die trockenen Slides wurden in einem luftdicht verschlossenen Slidebehälter bis zur Messung aufbewahrt.

Das Hybridisieren wurde nach der oben beschriebenen Methode mit Formamid durchgeführt. Alternativ dazu kam die Lucidea Hybridisierungskammer zum Einsatz, ein Gerät, dass zur Hybridisierung von bis zu 12 Slides gleichzeitig eingesetzt werden kann und über ein ausgeklügeltes Schlauch-Druck-System die Hybridierungslösung über dem Microarray ständig in Bewegung hält. Dadurch kommt die gespottete DNA ständig mit neuer farbstoffmarkierter DNA in Berührung, was die Hybridisierungsleistung und -qualität deutlich verbessert.

3.5.7 Probenverarbeitung bei Microarray-Experimenten mit sehr wenig totalRNA

Mit Hilfe des „CyScribe cDNA Post Labelling Kit“ von der Firma Amersham Biosciences ist es möglich, mit nur 500 ng totalRNA einen Microarray-Versuch durchführen zu können. Wie zuvor beschrieben, wurden bei den anderen Versuchen Mengen von 20-40 µg totalRNA eingesetzt. Das Verfahren beruht auf dem Post-Labeling, so dass erst nach der Reversen Transkription die Farbstoffmoleküle in die DNA eingefügt werden (Sandwich-Effekt). Die geringe Einsatzmenge ist natürlich von enormem Vorteil bei geringenvolumigen Geweben oder Zellverbänden, deren Genexpressionsstatus mit Hilfe der Microarray-Technologie untersucht werden soll. Nachteilig wirkt sich aber aus, dass durch den zusätzlichen Schritt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines systematischen Fehlers erhöht wird. Außerdem ist das Verfahren deutlich teurer als ein „normaler“ Microarray-Versuch.

Zur Durchführung der Methode wurde im ersten Schritt für die Reverse Transkription folgende Lösung zusammen pipettiert:

| | |
|----------|--------------------|
| x µl | mRNA, 500 ng |
| 1 µl | Nona-Random Primer |
| 1 µl | Oligo-dT-Primer |
| ad 11 µl | Aqua bidest. |

Nach dem Mischen der Lösung wurde sie für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis, wurde durch 10-minütiges Inkubieren bei Raumtemperatur die Primerbindung erreicht. In der Zwischenzeit wurde der folgende Mix vorbereitet und schließlich zum Ansatz pipettiert:

| | |
|------|-----------------------|
| 4 µl | 5x CyScript Puffer |
| 2 µl | 0,1 M DTT |
| 1 µl | dNTPs |
| 1 µl | AA-dUTP |
| 1 µl | Reverse Transkriptase |

Nach dem Mischen wurde die Lösung bei 42 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden 2 µl 2,5 M NaOH zugesetzt, gemischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden wurden 10 µl 2 M Hepes zugesetzt, gemischt und eine Reinigung mit GFX-Säulen entsprechend zugehörigem Protokoll durchgeführt. Die aufgereinigte cDNA war damit für die Farbstoff-Kupplung vorbereitet. Dafür wurde sie direkt in ein Aliquot des CyDye NHS Esters (Cy3 oder Cy5) gegeben. Nach dem Mischen durch Auf- und Abziehen mit der Pipette wurde die Lösung bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Dann wurden 15 µl 4 M Hydroxylamin zugesetzt und bei Raumtemperatur im Dunklen für 15 Minuten inkubiert, um die CyDye NHS Ester Moleküle zu deaktivieren, die während der Kupplungsreaktion nicht reagiert haben.

Im Anschluss daran wurde die Farbstoff-gelabelte cDNA mit Hilfe der AutoSeq G50 – Säulen gereinigt und die Hybridisierung wie oben beschrieben durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der altersspezifischen Genexpression

Im Zuge der Methodenentwicklung führte ich einige Microarray-Versuche durch, mit dem Ziel der Untersuchung der Genexpression von Kaliumkanal-Genen im Gesamtgehirn von Mäusen verschiedenen Alters. Untersucht wurden Tiere im Alter von 4, 9, 15 und 20 Tagen (P4, P9, P15, P20) im Vergleich zu adulten Tieren im Alter von ca. 8 Wochen.

Bei der Auswertung wurden die Werte der Jungtiere auf die Werte der adulten Tiere bezogen. Dementsprechend zeigen Differenzen über Null eine Hoch-Regulation an und Differenzen unter Null eine Down-Regulation. Hoch-Regulation bedeutet in diesem Fall eine stärkere Expression bei den Jungtieren. Down-Regulation eine stärkere Expression bei den adulten Tieren.

4.1.1 Vergleich von adulten und 4-Tage-alten Tieren

Für die Untersuchung der Unterschiede in der Genexpression wurden die Gehirne von 5 vier Tage alten Jungtieren beider Geschlechter gepoolt und mit gepoolter totalRNA von adulten männlichen Tieren des gleichen Mausstammes verglichen.

Es wurden drei Experimente durchgeführt, wobei kein *Dye-Switch* angewendet wurde. Die Datensätze der einzelnen Experimente wurden nach Logarithmierung und Normalisierung nach Lowess aufeinander angeglichen. Aufgrund des fehlenden *Dye-Switches* ist die Qualität der Daten nur schwer zu bewerten. Deshalb wurden die Filterkriterien insofern verstärkt, dass Intensitätsdaten mit Standardabweichungen über 0,30 nicht zur Auswertung herangezogen wurden.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Genexpression.

Abb. 4-1 zeigt die unterschiedliche Genexpression bei den Housekeeping Genen.

Die beiden Gene β -Aktin und α -Tubulin waren zu ca. 50% bzw. 100% hoch reguliert. Da die Jungtiere sich in einer schnellen körperlichen Entwicklung befinden und die Zellteilung entsprechend im Vergleich mit adulten Tieren stark erhöht ist, ist die Hochregulation dieser für Zellfunktion und -entwicklung typischen Gene nicht unerwartet. Die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase erscheint aufgrund der Microarray-Daten als down-reguliert.

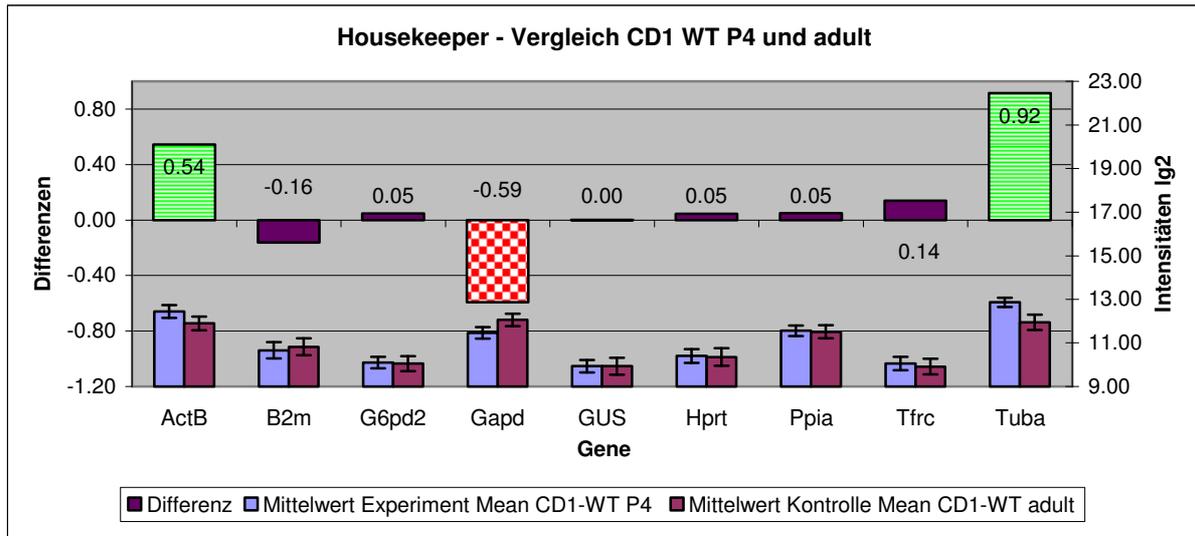


Abb. 4-1 Vergleich der Housekeeping Gene im Verhältnis P4 zu adult,
 Mauslinie CD1 WT, (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur
 Basis 2, Normalisierung nach Lowess),
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

In der Kaliumkanal-Genfamilie waren ebenfalls zahlreiche Regulationen zu beobachten. Abb. 4-2 zeigt die als reguliert gemessenen Gene.

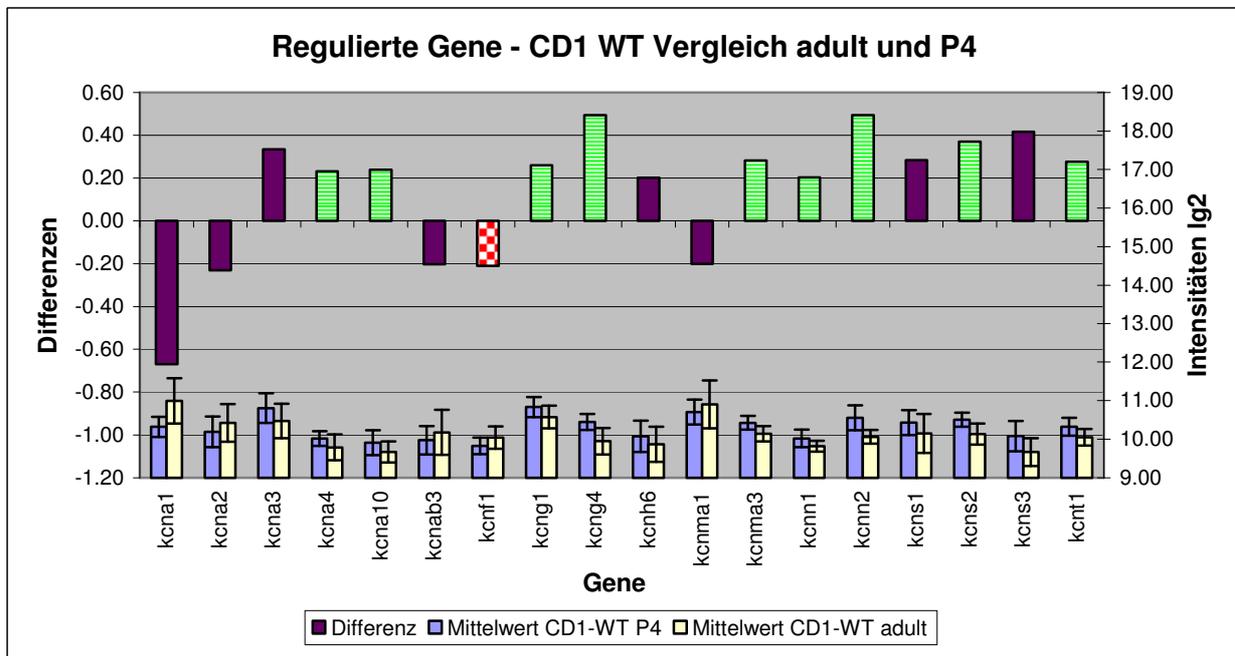


Abb. 4-2 Als reguliert auftretende Gene im Verhältnis P4 zu adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung
 zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Wie oben erwähnt, wurden die Daten aufgrund des fehlenden *Dye-Switches* streng gefiltert. Alle Differenzen, die für Gene auftreten, deren Intensitäten Standardabweichungen von über 0,3 aufweisen, wurden nicht ausgewertet. In der Abbildung sind diese Gene flächig dargestellt (z.B. *kcna1*).

Leider sind über die Anpassung der Genexpression von Kaliumkanälen während der Wachstumsphase kaum Daten verfügbar. Deshalb lassen sich nicht alle Ergebnisse des Microarray-Versuches erschöpfend erklären und bewerten. Sie können jedoch Ansätze für weitere Untersuchungen darstellen.

Die liniert markierten Gene sind hoch reguliert. Die beiden Gene *kcnn1* und *kcnn2* werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert und hier bekannterweise im pränatalen und früh postnatalen Gehirn. Ähnliches gilt für *kcns2* und *kcns1* [0502].

Die Genfamilien der Einwärtsgleichrichter (*kcnj*) und der Zweiporen-Domänen-Kaliumkanäle (*kcnk*) werden im Folgenden einzeln dargestellt.

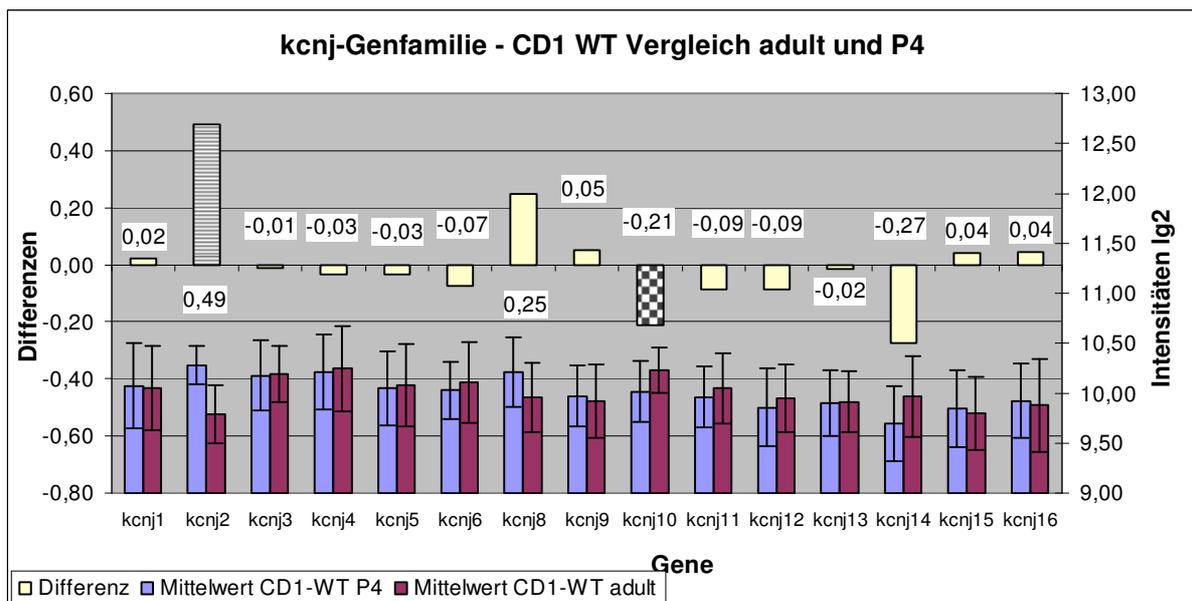


Abb. 4-3 Vergleich der Gene der *kcnj*-Kaliumkanalfamilie im Verhältnis P4 und adult, Mauslinie CD1 WT
(Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Nur wenige der *kcnj*-Kaliumkanal-Gene zeigten Regulation (Abb. 4-3). Dazu gehört *kcnj2* (IRK1). Diese Kanaluntereinheit wird entsprechend früheren histologischen Untersuchungen [9702] in verschiedenen Teilen des Gehirnes wie Vorderhirn und olfaktorischer Bulbus sowie im Herzen exprimiert.

Der Kaliumkanal *kcnj10* wird hauptsächlich in Gliazellen exprimiert [0502]. Deshalb ist es nachvollziehbar, dass bei sehr jungen Tieren verhältnismäßig weniger *kcnj10* exprimiert wird, da diese Tiere die entsprechenden Gliazellen noch ausbilden [0502].

Leider zeigen auch die Intensitäten der *kcnk*-Kaliumkanal-Genfamilie hohe Standardabweichungen, so dass die Ergebnisse nur bedingt auszuwerten sind (Abb. 4-4). Der einzig als hoch reguliert gemessene Kanal ist *kcnk16* (TALK). Dieser Kanal ist hinsichtlich seiner Expression und Funktion im Mausgehirn noch recht unbekannt. Daher ist dieses Ergebnis nur schwer zu bewerten.

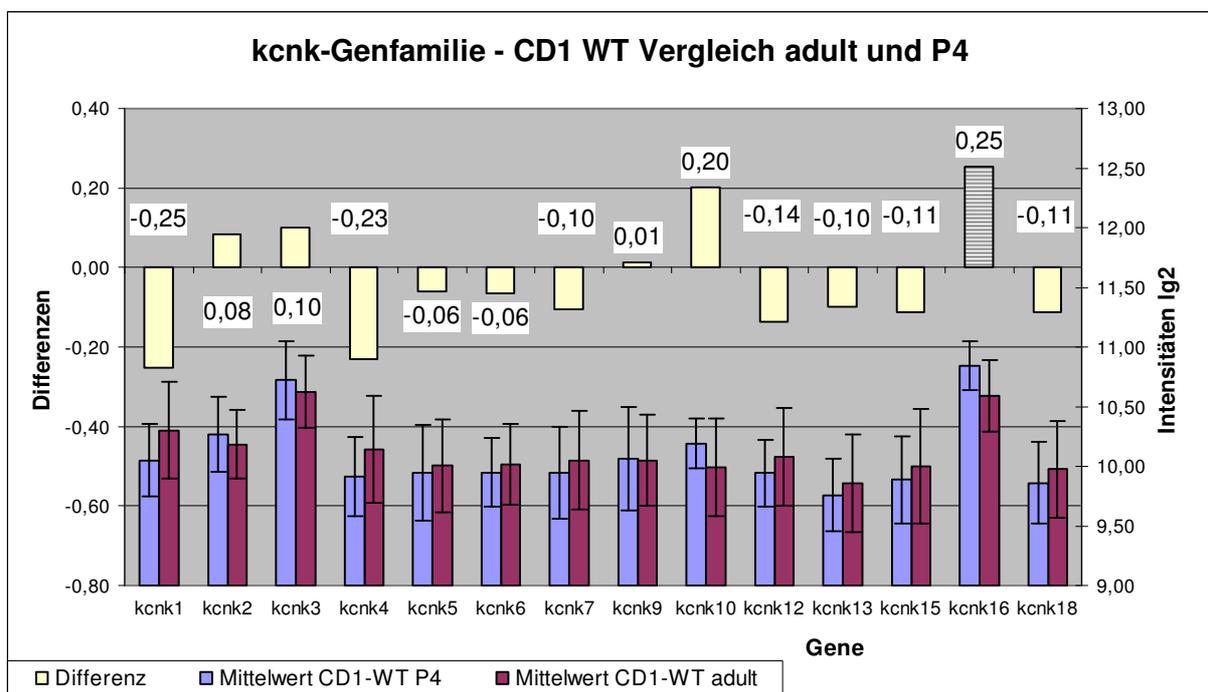


Abb. 4-4 Vergleich der Gene der *kcnk*-Kaliumkanalfamilie im Verhältnis P4 und adult, Mauslinie CD1 WT
(Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

4.1.2 Vergleich von adulten und 9-Tage-alten Tieren

Für die Untersuchung der Unterschiede in der Genexpression wurden die Gehirne von 5 neun Tage alten Jungtieren beider Geschlechter gepoolt und mit gepoolter totalRNA von adulten männlichen Tieren des gleichen Mausstammes verglichen.

Es wurden zwei Experimente durchgeführt, wobei kein *Dye-Switch* angewendet wurde. Die Datensätze der einzelnen Experimente wurden nach Logarithmierung und Normalisierung nach Lowess aufeinander angeglichen. Aufgrund des fehlenden *Dye-Switches* wurden die Filterkriterien insofern verstärkt, dass Intensitätsdaten mit Standardabweichungen über 0,30 nicht zur Auswertung herangezogen wurden.

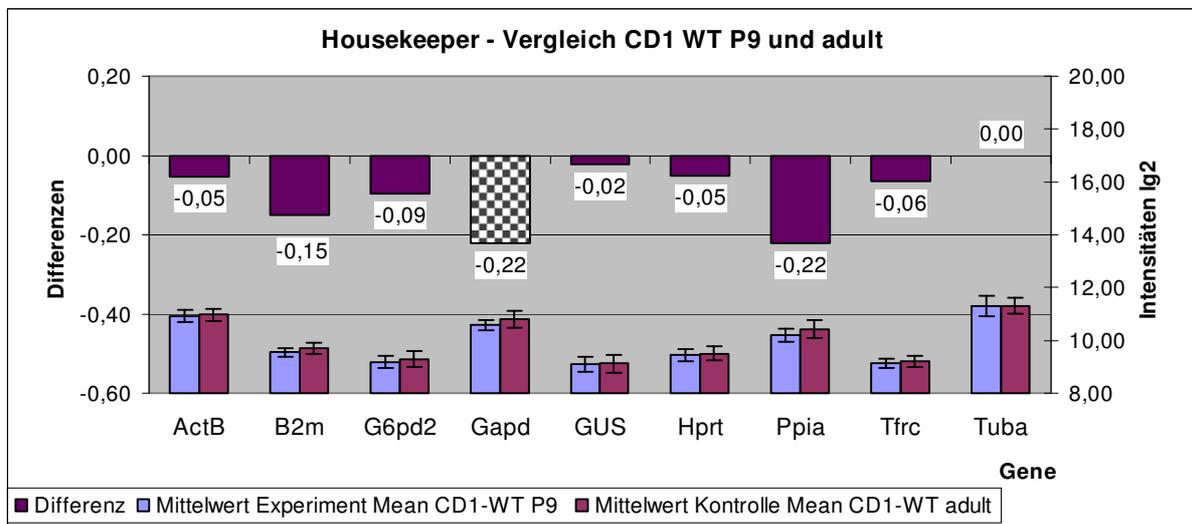


Abb. 4-5 Vergleich der Housekeeping Gene im Verhältnis P9 zu adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur
 Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Wie aus Abb. 4-5 ersichtlich, zeigen die Messergebnisse der Housekeeper bei den neun Tage alten Tieren kaum Regulationen an. Wie bei den vier Tage alten Tieren tritt bei GAPD eine Differenz auf, die auf Down-Regulation schließen lässt.

Abb. 4-6 zeigt die aufgrund der Messergebnisse als reguliert anzusehenden Kaliumkanal-Gene. Verglichen mit den zuvor vorgestellten Ergebnissen der vier Tage alten Tiere zeigten die neun Tage alten Tiere weniger regulierte Gene, was möglicherweise durch die schnell fortschreitende Entwicklung der Tiere als eine Annäherung an die erwachsenen Tiere zu erklären ist.

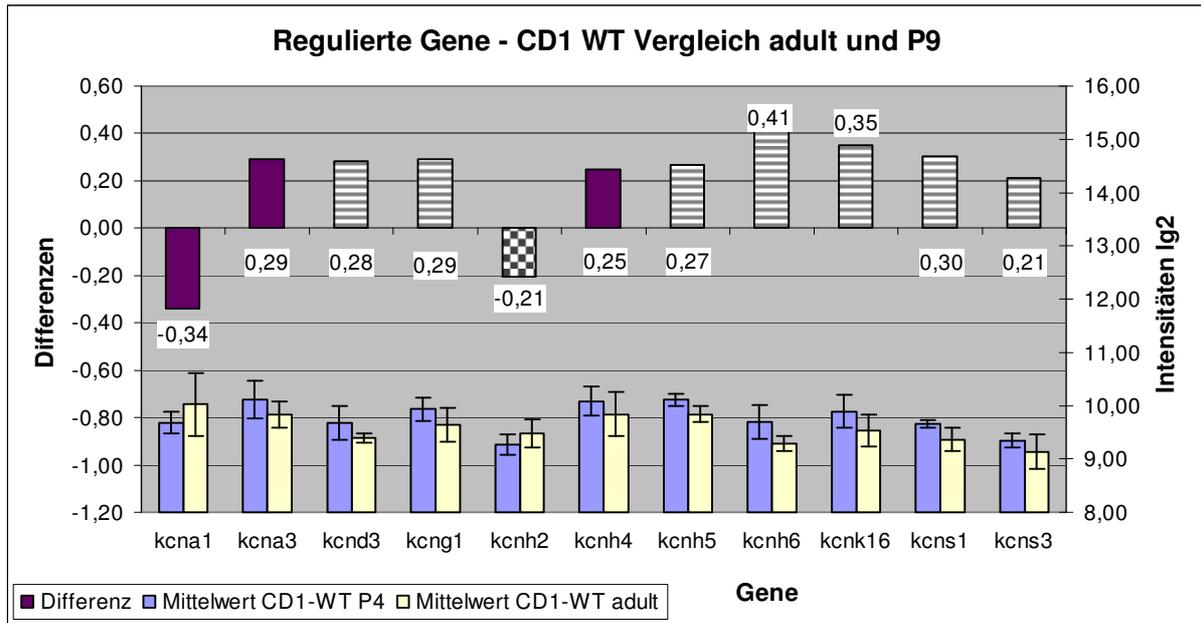


Abb. 4-6 Als reguliert auftretende Gene im Verhältnis P4 zu adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung
 zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Wie zuvor wiesen die Intensitäten bei den kcna-Genen recht hohe Standardabweichungen auf. Der Grund dafür kann unter anderem die Randlage der Spots auf dem Slide sein, da am Rand die Farb- und Hintergrundeffekte besonders starken Einfluss auf die Intensitäten nehmen. Die beiden Gene kcns1 und kcns3 zeigten wie bei den vier Tage alten Tieren eine Hoch-Regulation, genauso wie kcnk16 (TALK). Außerdem zeigen einige Gene der kcnh-Familie Regulation. Gerade bei diesen Genen sind nur wenige Daten über ihre Verteilung und vor allem Funktion verfügbar. Gemäß den Microarray-Daten sollte man eine besondere Funktionalität in Jungtieren in Erwägung ziehen und weiter untersuchen.

Abb. 4-7 zeigt die Gene der kcnj-Genfamilie. Keines der Gene zeigte eine messbare deutliche Regulation. Der einzig interessante Messpunkt ist kcnj2. Er liegt zwar ein wenig unter der Filtergrenze einer Differenz von mindestens 0,2, ist aber aufgrund der geringen Standardabweichungen als Messergebnis auswertbar. Außerdem entspricht das Ergebnis den Messdaten bei den vier Tage alten Tieren, bei denen eine noch deutlichere Hoch-Regulation zu sehen war.

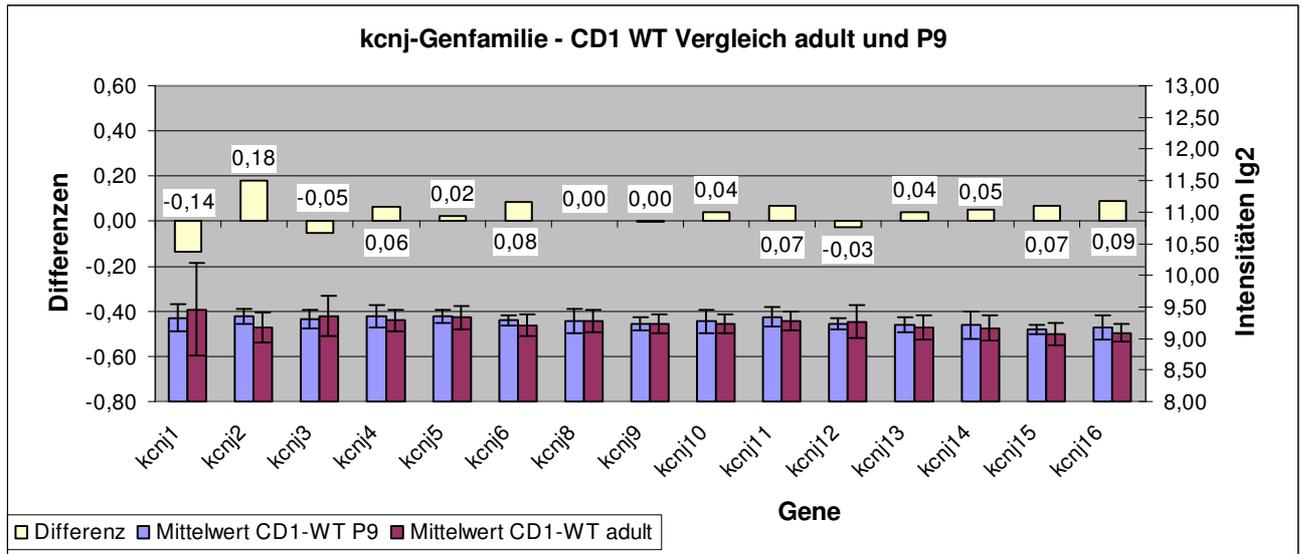


Abb. 4-7 Vergleich der Gene der kcnj-Kaliumkanalfamilie
 im Verhältnis P9 und adult, Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach
 Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Abb. 4-8 zeigt die Gene der kcnk-Genfamilie. Die beiden Gene kcnk6 und kcnk15 konnten nicht ausgewertet werden, da die Intensitäten aufgrund von Verunreinigen auf dem Slide zu stark von Ausreißern behaftet waren.

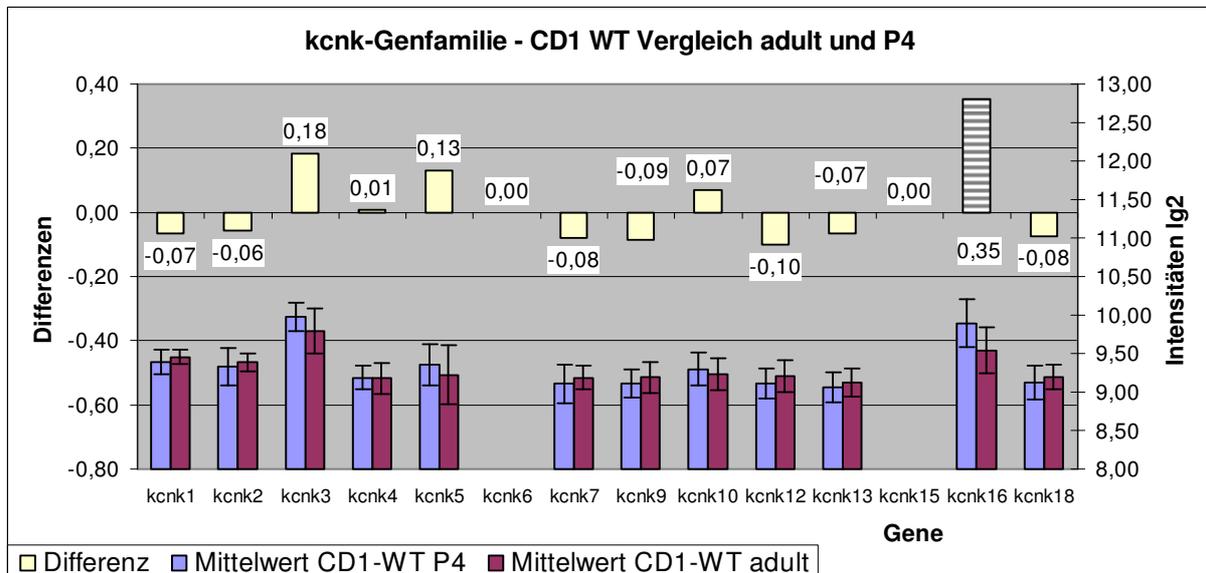


Abb. 4-8 Vergleich der Gene der kcnk-Kaliumkanalfamilie
 im Verhältnis P9 und adult, Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach
 Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Abgesehen davon zeigt wie zuvor erwähnt nur *kcnk16* eine Hoch-Regulation.

Die Ergebnisse der neun Tage alten Tiere entsprachen im Wesentlichen den Beobachtungen bei den vier Tage alten Tieren. Da sich über den Verlauf der Messungen einige Gene als interessante Kandidaten herauskristallisiert haben, wird deren Verlauf über die vier untersuchten Messpunkte bei den Altersstufen bei P4, P9, P15 und P20 im Anschluss an die Erläuterungen zu den einzelnen Altersstufen gesondert dargestellt.

4.1.3 Vergleich von adulten und 15-Tage-alten Tieren

Zur Untersuchung der Genexpression in den Gehirnen der 15 Tage alten Tiere wurde ein Pool aus der Gehirn-RNA von fünf Tieren mit dem Pool der erwachsenen Tiere verglichen, der auch für die anderen Vergleichsmessungen bei Lebenstag 4, 9 und 20 eingesetzt wurde. Es wurden zwei Experimente durchgeführt.

Abb. 4-9 zeigt das Regulationsprofil der Housekeeping Gene. Wie zuvor zeigten GAPD und α -Tubulin messbare Regulationen, wobei GAPD down und α -Tubulin hoch reguliert wird.

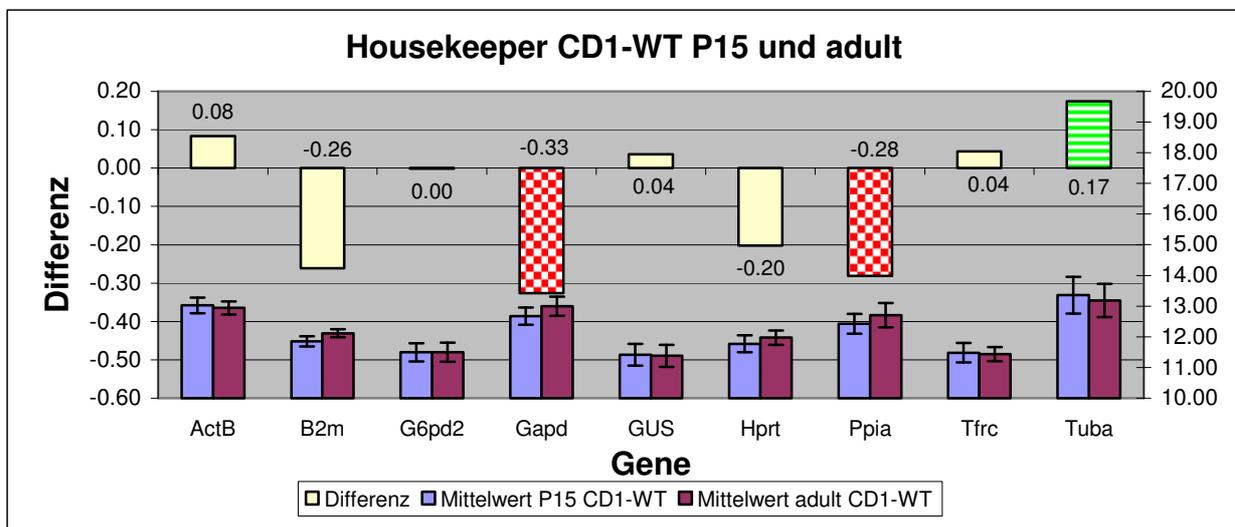


Abb. 4-9 Vergleich der Housekeeping Gene im Verhältnis P15 zu adult,

Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur

Basis 2, Normalisierung nach Lowess)

Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

In der folgenden Abbildung (Abb. 4-10) sind die beim Vergleich der P15-Jungtiere mit adulten Tieren als reguliert resultierenden Gene aufgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Vielzahl von Hoch-Regulationen. Wie zuvor sind Gene der *kcnh*-Gruppe betroffen. Das sind spannungsabhängige Kaliumkanäle, die größtenteils in Form von Heteromeren agieren und deren Funktion bis jetzt kaum geklärt ist. Außerdem traten Regulationen bei den beiden Calciumabhängigen Kaliumkanälen *kcnma1* (Down-Regulation) und *kcnma3* (Hoch-Regulation) auf. Auch die beiden Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle *kcnk3* (GIRK1) und *kcnk16* (TALK) wurden hoch reguliert.

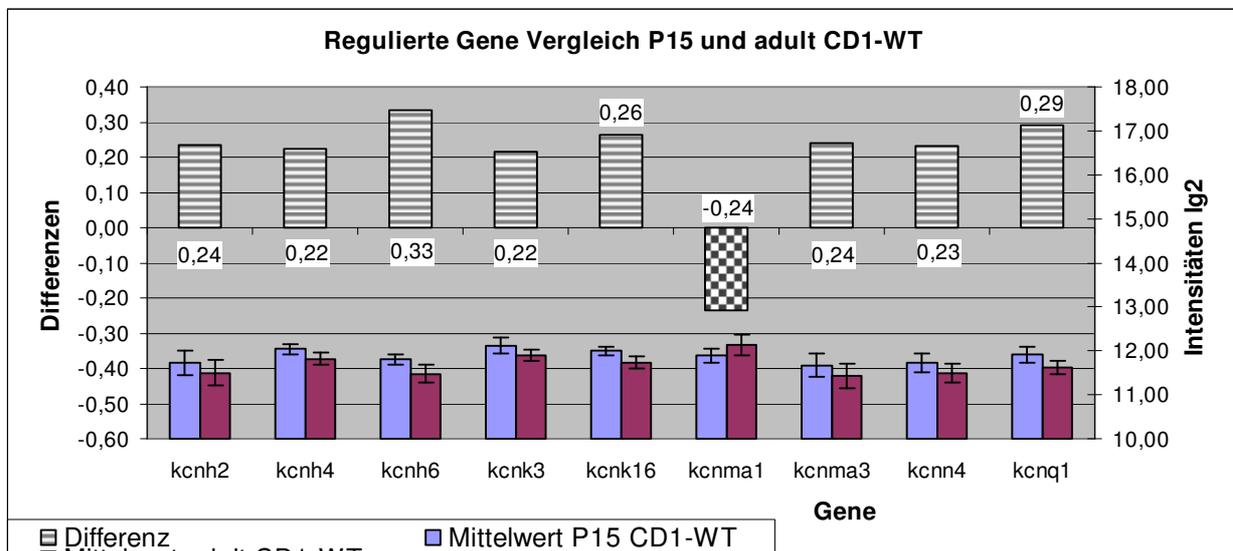


Abb. 4-10 Als reguliert auftretende Gene im Verhältnis P15 zu adult, Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Bei der *kcnj*-Genfamilie zeigten sich im Vergleich zwischen 15 Tage alten Tieren und adulten Tieren keine beachtenswerten Regulationen, wenn man bei der Auswertung die Standardabweichungen angemessen berücksichtigt.

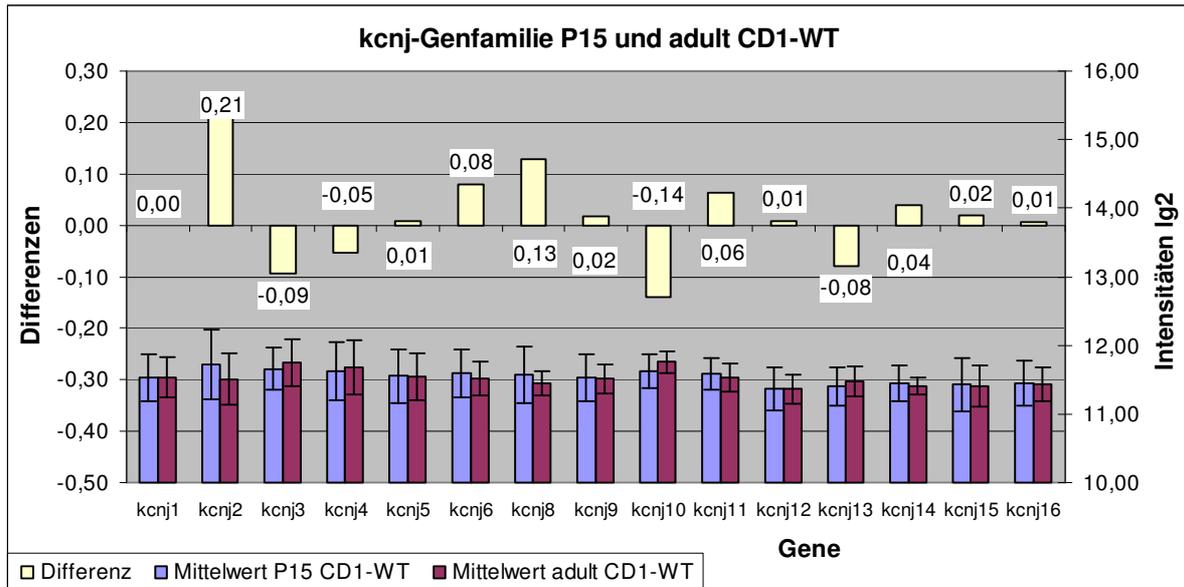


Abb. 4-11 Vergleich der Gene der kcnj-Kaliumkanalfamilie P15 und adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2,
 Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Wie zuvor erwähnt, wiesen in der kcnk-Genfamilie zwei Gene im Vergleich zu den adulten Tieren erhöhte Genexpressionswerte auf. Das waren kcnk3 (GIRK1) und kcnk16 (TALK). Beide Gene wiesen eine ca. 25%ige Hoch-Regulation auf.

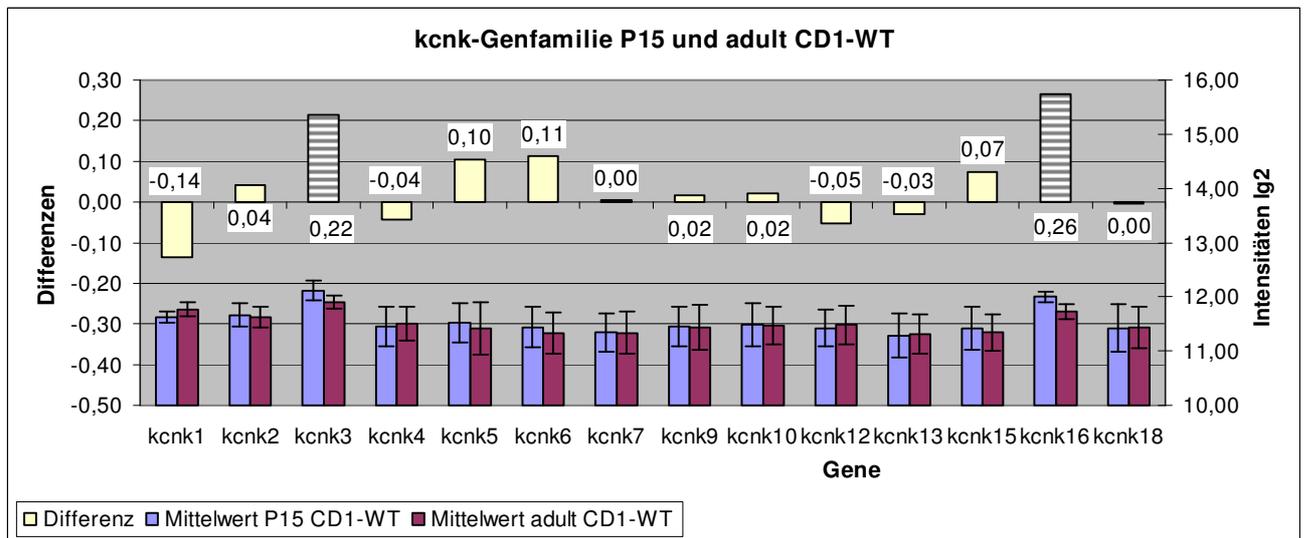


Abb. 4-12 Vergleich der Gene der kcnk-Kaliumkanalfamilie P15 und adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2,
 Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

4.1.4 Vergleich von adulten und 20-Tage-alten Tieren

Für diesen Vergleich der relativen Genexpression von 20-Tagen alten CD1-WT-Mäusen mit ihren 8-Wochen-alten, adulten Artgenossen des gleichen Stammes wurde nur ein Experiment durchgeführt. Die im Folgenden präsentierten Daten können also allenfalls als Grob-Screening betrachtet werden.

Abb. 4-13 zeigt den Vergleich der Housekeeping Gene. Im Gegensatz zu den jüngeren Tieren lagen die 20 Tage alten Tiere schon deutlich näher am Genexpressionslevel der adulten Tiere. Die maximale Differenz lag bei 0,25 in Form einer Hoch-Regulation bei α -Tubulin. Wie zuvor lässt sich dieser Wert gut erklären, da sich diese Tiere wie ihre jüngeren Artgenossen immer noch in einer schnellen körperlichen Entwicklung befinden. Im Alter von ca. 20 Tagen werden die Jungtiere von der Mutter getrennt und haben alle erforderlichen Fähigkeiten voll ausgebildet.

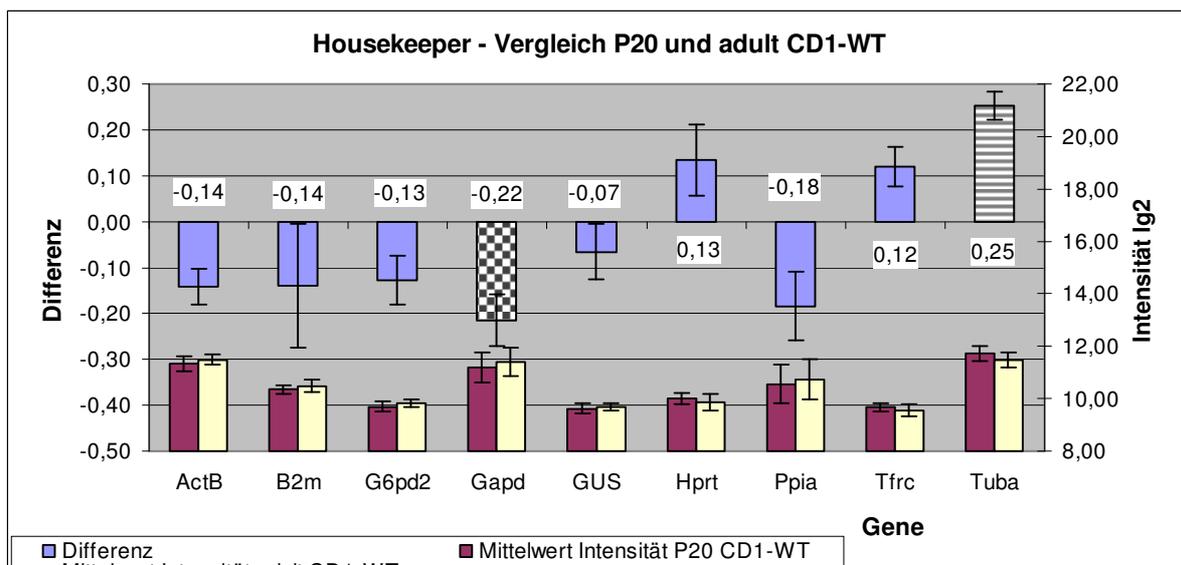


Abb. 4-13 Vergleich der Housekeeping Gene im Verhältnis P20 zu adult,
 Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur
 Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
 Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Die folgende Abbildung (Abb. 4-14) zeigt die als reguliert erscheinenden Gene. Auffällig ist, dass alle Gene, die Differenzen über 0,2 bei einer Standardabweichungen der Intensitäten von unter 0,3 zeigen, nach oben reguliert zu sein scheinen.

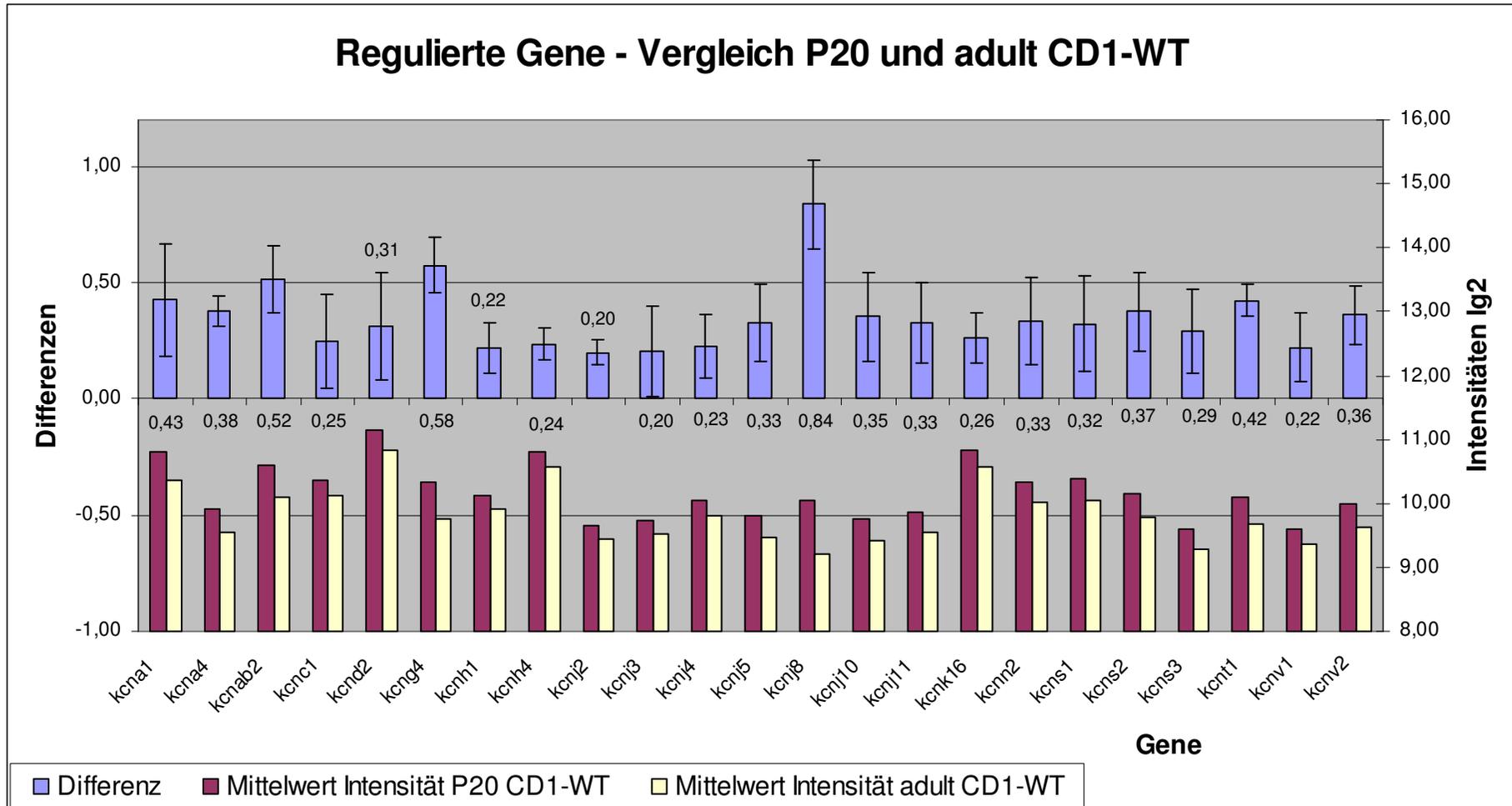


Abb. 4-14 Als reguliert auftretende Gene im Verhältnis P20 zu adult, Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess), Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Das lässt sich nur durch zwei mögliche Gründe erklären: die Ergebnisse sind falsch positiv, was auf einen systematischen Fehler zurückzuführen wäre oder die Tiere zeigen bei all diesen Genen aufgrund ihrer schnellen körperlichen Entwicklung erhöhte Genexpressionswerte. Um das zu klären, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

Bei der *kcnj*-Genfamilie waren keine deutlichen Regulationen zu beobachten (Abb. 4-15). Die meisten Intensitäten und Differenzen zeigten sehr hohe Standardabweichungen. Auffällig war einzig *kcnj8*, welcher bei guter Standardabweichung eine deutliche Hochregulation zeigt.

Außerdem könnte für den guten Messwert auch der *Dye-Switch*-Effekt verantwortlich sein. Bei anderen Experimenten hat sich gezeigt, dass gerade die Werte, die aufgrund ihrer geringen Standardabweichung und guten Reproduzierbarkeit über mehrere Experimente hinweg einen besonders guten Eindruck machen, häufig dem *Dye-Switch* nicht standhalten können.

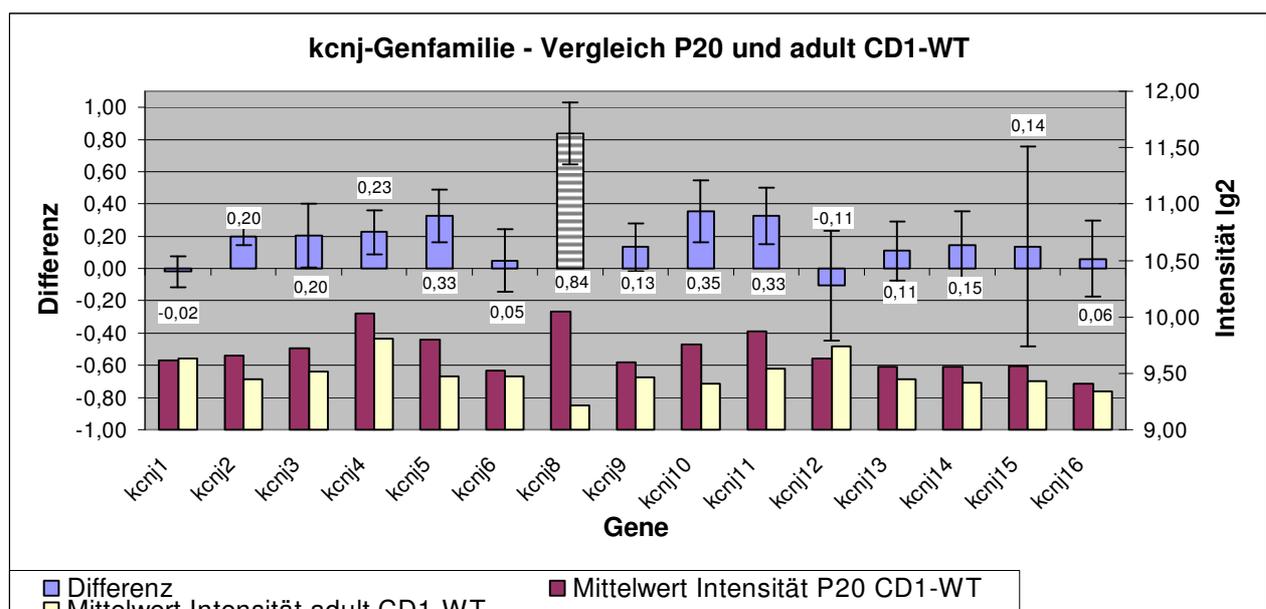


Abb. 4-15 Vergleich der Gene der *kcnj*-Kaliumkanalfamilie P20 und adult, Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess)
Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

Ähnliches wie für die *kcnj*-Gene gilt auch für die *kcnk*-Gene (Abb. 4-16). Die Standardabweichungen bei Intensitäten und Differenzen waren relativ hoch und kaum einer der Regulationswerte war deshalb auswertbar. Einzig *kcnk16* zeigte eine leichte Hochregulation, was über alle untersuchten Altersstufen hinweg konsistent ist. Die Differenz und damit die Höhe der Regulation nimmt aber im Verlauf der Entwicklung der Jungtiere ab.

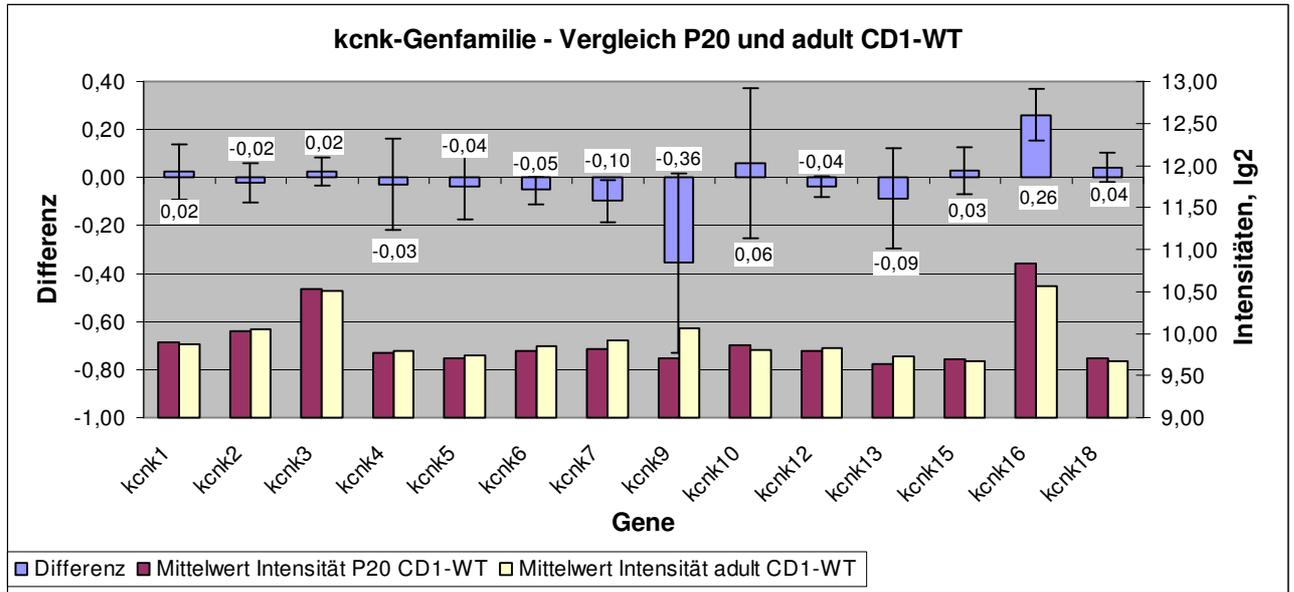


Abb. 4-16 Vergleich der Gene der kcnk-Kaliumkanalfamilie P20 und adult,
Mauslinie CD1 WT (Intensitätsunterschiede nach Logarithmierung zur Basis 2,
Normalisierung nach Lowess)
Kariert: Down-Regulation, liniert: Hoch-Regulation

4.1.5 Regulationsverlauf während der postnatalen Entwicklungsphase

Im Folgenden möchte ich einzelne Gene beschreiben, die sich während der Messungen als interessant herausgestellt haben.

Zu Beginn wird auf einige Housekeeping Gene eingegangen, weil deren Genexpression schon genauer untersucht wurde und mehr Informationen verfügbar sind, als zu den weniger bekannten Kalium-Kanälen. Daher sind die Daten besser zu bewerten und geben einen Hinweis auf die Qualität der Ergebnisse.

Beginnen möchte ich mit β -Aktin. Dieses Gen codiert für ein Strukturprotein im Zytoskelett und wird dementsprechend zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung von Gewebematerial ubiquitär exprimiert. Die Ergebnisse in Abb. 4-17 zeigten für sehr junge Tiere (P4) deutliche erhöhte Genexpressionswerte im Vergleich zu den erwachsenen Tieren. Bereits ab Datenpunkt Tag 9 der postnatalen Entwicklung sank das Expressionsniveau jedoch auf einen zu den adulten Tieren vergleichbaren Wert und blieb dort über den gesamten restlichen Messverlauf.

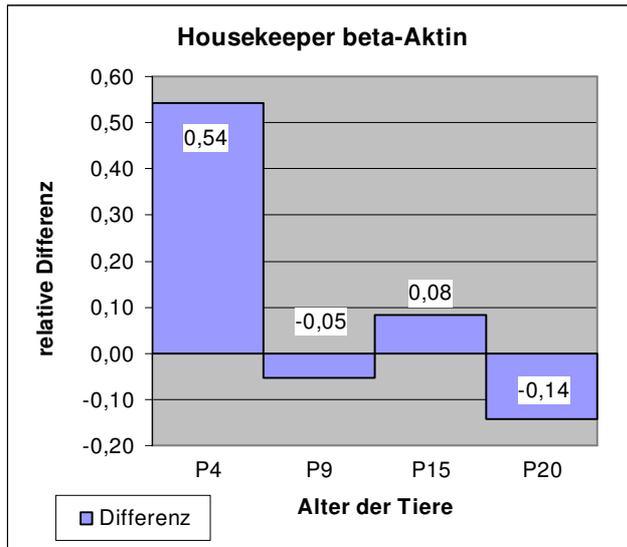


Abb. 4-17 Relative Genexpression für das Housekeeping Gen β -Aktin im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren, logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Das nächste beachtenswerte Gen ist GAPD, die Glycerinaldehyd-phosphat-dehydrogenase. Auch dieses Gen wird ubiquitär in großer Menge exprimiert. Auffällig war hier die im Verhältnis zu den adulten Tieren deutlich geringere Expression (Abb. 4-18).

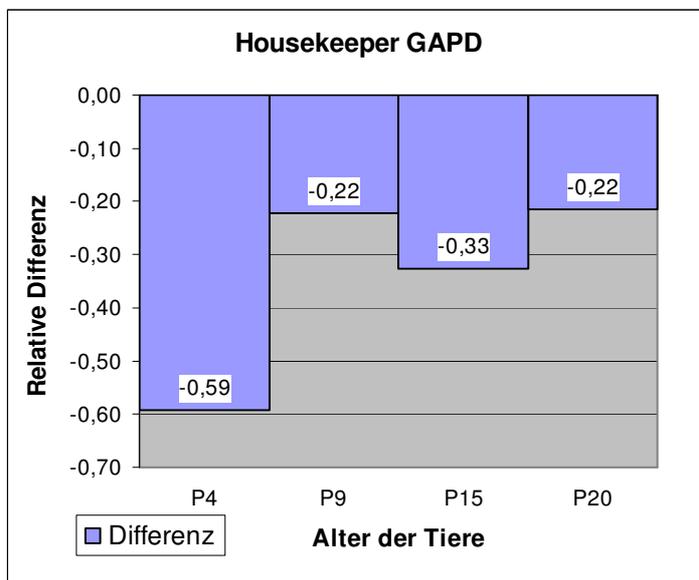


Abb. 4-18 Relative Genexpression für das Housekeeping Gen GAPD im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren, logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Das in der folgenden Abbildung (Abb. 4-19) gezeigte Gen α -Tubulin codiert ein Protein, das einen der Bausteine der Mikrotubuli darstellt. Diese sind unter anderem für den Molekültransport in Zellen verantwortlich. Die Genexpression im Gehirngewebe war bei allen Messungen sehr hoch.

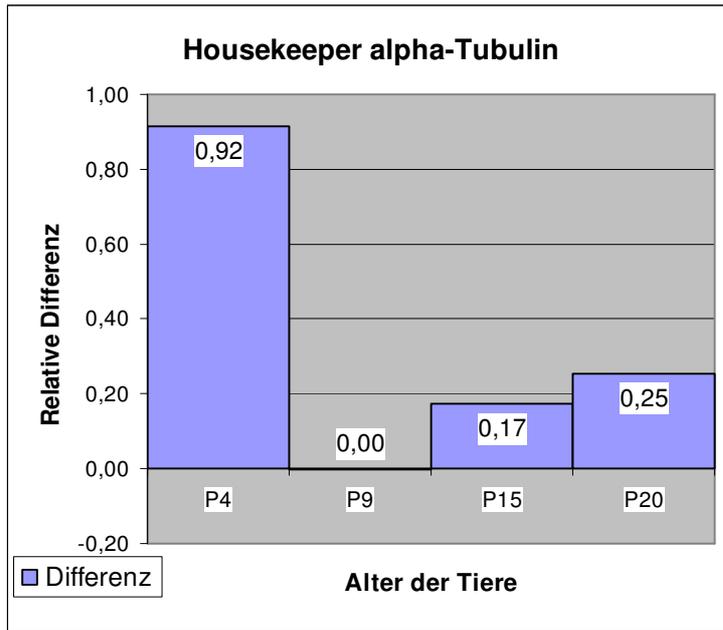


Abb. 4-19 Relative Genexpression für das Housekeeping Gen α -Tubulin im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren,

logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Es zeigte sich in der Messreihe, dass nur bei sehr jungen Tieren (P4) eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu den adulten Tieren auftritt. Im Laufe weniger Entwicklungstage regulierte der Wert sich auf das auch für erwachsene Tiere übliche Normalmaß. Interessant sind hier die Parallelen zu den Ergebnissen, die zuvor für β -Aktin aufgeführt wurden. Bei beiden Housekeeping Genen handelt es sich um Gene, die Strukturproteine codieren.

Bei den untersuchten Kaliumkanal-Genen wiesen nur wenige Gene Expressionsmuster auf, die sich über den gesamten Verlauf der Entwicklung der Jungtiere im Verhältnis zu den erwachsenen Tieren veränderten. Einige der Gene, die zu verschiedenen untersuchten Entwicklungsstadien deutliche relative Differenzen aufwiesen, sind im Folgenden dargestellt.

Abb. 4-20 zeigt den relativen Expressionsverlauf von *kca1*. Dabei handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der ubiquitär exprimiert wird. Die Messungen zeigten für dieses Gen eine verhältnismäßig geringere Expression bei den jungen Tieren am Tag 4, 9 und 15. Dann änderte sich das Bild und die Genexpression nahm zu. Dabei kam es bei Tag 20 zu einer verhältnismäßig höheren Expression bis sich die Genexpression auf den für die adulten Tiere durchschnittlichen Wert einpendelte.

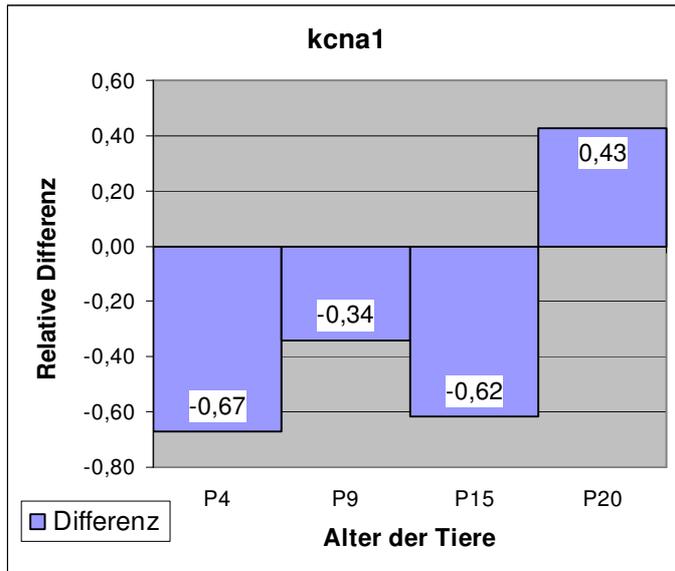


Abb. 4-20 Relative Genexpression für kcna1 im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren,
 logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Der spannungsabhängige Kaliumkanal kcna3 zeigte bei den sehr jungen Tieren (P4 und P9) eine leichte Hoch-Regulation um ca. 30% im Vergleich mit den adulten Tieren (Abb. 4-21). Dann sank die Genexpression dieses Kaliumkanals bis auf ca. 40% unter dem Genexpressionswert der adulten Tiere, um dann über eine leichte Hoch-Regulation den Normalwert zu erreichen.

Damit ist für beide kcna-Kanäle von einer Regulation während der postnatalen Entwicklung auszugehen. Angesichts der Tatsache, dass die Kanäle meist als ubiquitär exprimiert dargestellt werden, ergibt sich hier weiterer Forschungsbedarf.

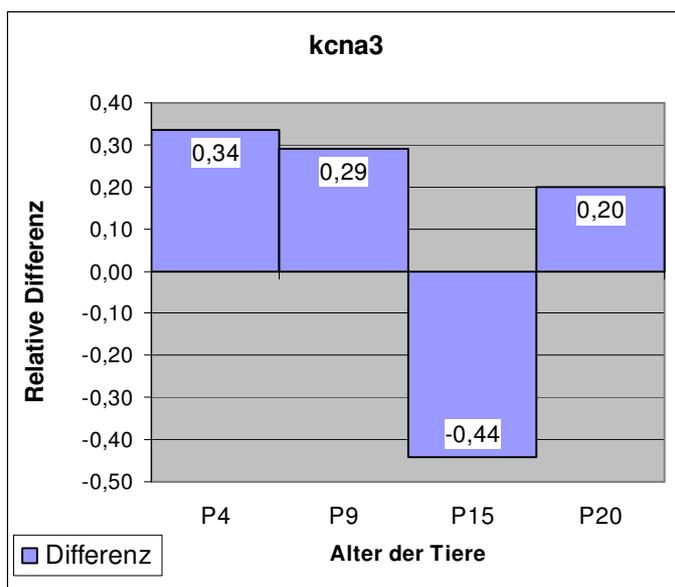


Abb. 4-21 Relative Genexpression für kcna3 im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren,
 logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Über das folgende Gen *kcng4* sind nur recht wenige Daten bekannt. Es wird beim adulten Menschen bekanntermaßen im Gehirn (Substantia nigra und Cerebellum), in der Skelettmuskulatur und im Rückenmark exprimiert [0502]. Expressionsdaten zur Maus sind nicht bekannt. *Kcng4* gehört zu einer Gruppe von spannungsabhängigen Kaliumkanal-Genen, die bei alleiniger Expression nicht fähig sind, einen Stromfluss hervor zu rufen. Die Gene dieser Gruppe agieren als Modifier bzw. Silencer und unterdrücken *Kv2.1*- und *Kv2.2*-Ströme (Genfamilie *kcnb*), woraus eine verlängerte Aktivierung und eine Verlangsamung der Inaktivierung resultiert.

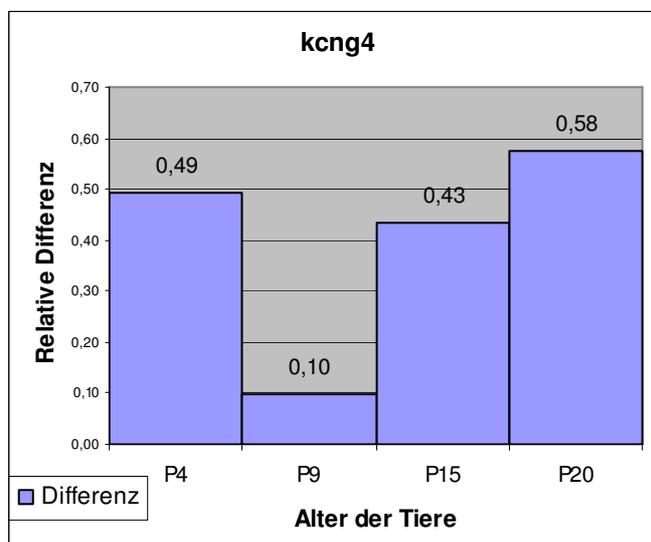


Abb. 4-22 Relative Genexpression für *kcng4* im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren, logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Abb. 4-22 zeigt den Verlauf der relativen Genexpression. Das Gen ist zu jedem untersuchten Zeitpunkt bei Tag 4, 9, 15 und 20 hoch reguliert mit einer durchschnittlichen Regulation von 10-60%. Interessant wären hier sicherlich noch weitere Untersuchungen, um festzustellen, in welchem Alter der Normalwert für adulte Tiere erreicht wird.

Kcng4 ist eines der Gene, das sich bei Kontrolle des *Dye-Switches* als problematisch herausgestellt hat (vgl. Kapitel 3.3.5). Deshalb sind die zu *kcng4* ermittelnden Daten mit der nötigen Vorsicht zu betrachten.

Das nächste Gen – *kcnh6* – ist ebenfalls noch nicht so umfangreich untersucht, dass eine Bewertung der Messergebnisse mit Hilfe bekannter Daten möglich wäre. Es handelt sich um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der hauptsächlich im Gehirn, aber auch in anderen Geweben wie Uterus, Leiomyosarcom und Lactotrophen Zellen exprimiert wird. Im Gehirn liegt die Expression dieses Genes am Tag 4 ca. 20% über der durchschnittlichen Genexpression adulter Tiere (Abb. 4-23). Dann steigt die relative Expression auf ca. 40% (P9)

und ca. 30% (P15) an, um sich zum Tag 20 auf einen Wert nahe der adulten Genexpression anzugleichen.

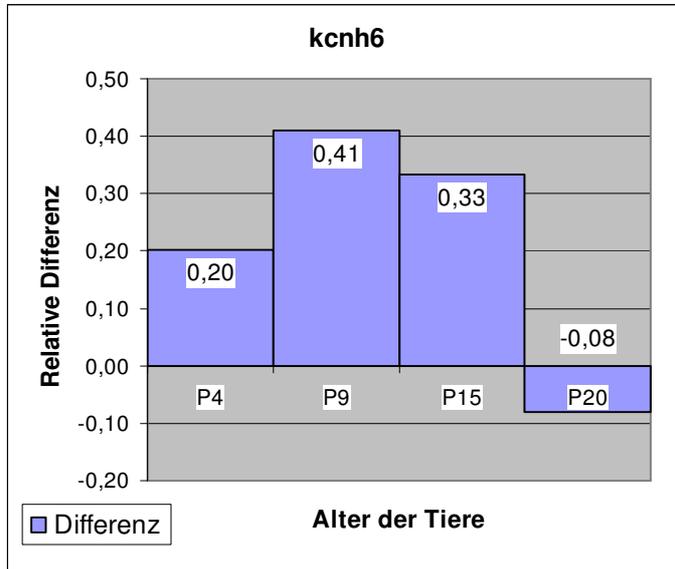


Abb. 4-23 Relative Genexpression für kcnh6 im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren,
logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Das folgende Gen – *kcnj2* – wird neben dem Vorderhirn vor allem im Herz und der Skelettmuskulatur exprimiert. Der resultierende Kanal ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und die Repolarisationsphase beim Aktionspotential im Herzen. Dieses Gen weist über die gesamte Entwicklung der Jungtiere hinweg eine relative Hoch-Regulation auf (Abb. 4-24). Am Tag 4 zeigt sich dabei ein Wert von ca. 50% und bei den weiteren drei Messpunkten (P9, P15, P20) von ca. 20%.

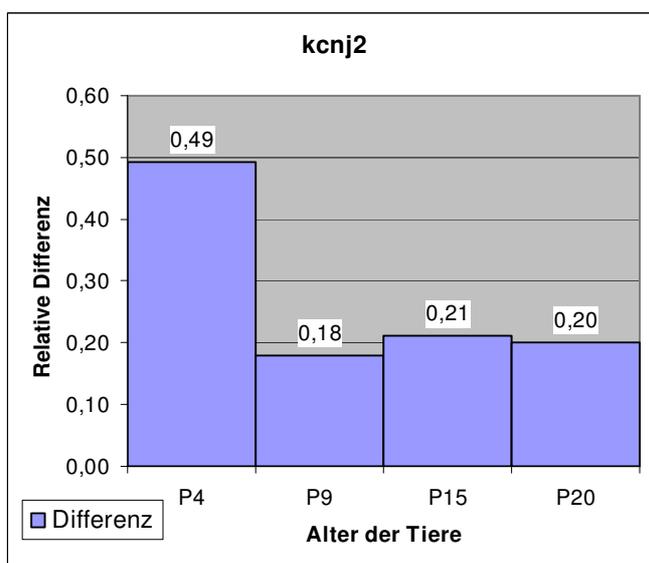


Abb. 4-24 Relative Genexpression für kcnj2 im Verlauf der körperlichen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebenstag, verglichen mit adulten Tieren,
logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Das letzte der genauer zu betrachtenden Gene ist *kcnk16*. Die Gene von Mensch und Maus unterschieden sich im Fall von *kcnk16* deutlich. So gibt es beim Menschen vor allem Expressionsdaten zu Spinalganglien, Rückenmark, Herz, Lunge, Leber und Pankreas. Bei der Maus dagegen haben die Microarray-Ergebnisse auch eine deutliche Expression im Gehirn gezeigt. Bei den Jungtieren ist das Gen bei allen 4 Messwerten leicht (um ca. 30%) hoch reguliert.

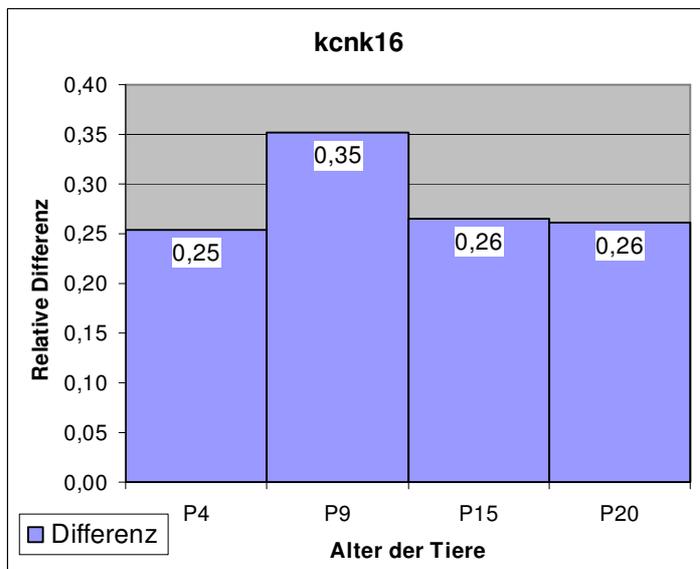


Abb. 4-25 Relative Genexpression

für *kcnk16* im Verlauf der postnatalen Entwicklung der Jungtiere vom 4. bis zum 20. Lebensstag, verglichen mit adulten Tieren, logarithmiert zur Basis 2, Normalisierung nach Lowess, Bildung der relativen Differenzen durch den Bezug auf adulte Tiere

Die Versuchsreihe zeigt die Möglichkeiten der Microarray-Methode, aber auch ihre Grenzen auf. Die Versuche geben einen schnellen und umfassenden Überblick über die Genexpression der untersuchten Gene. Viele Ergebnisse können durch entsprechende Literaturstellen belegt werden und beweisen damit die Qualität der Messungen. Auch die innere Konformität der Messungen belegt dies.

Die gemessenen Regulationswerte an sich sind mit durchschnittlich 20-30% niedriger als erwartet. Aus meiner Sicht liegt die Ursache dafür in der sehr stringenten Auswertungsmethode. Diese wurde gewählt, um die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen zu minimieren, auch auf die Gefahr hin, auf dem Weg dahin einige Messergebnisse zu „opfern“. Außerdem muss man bedenken, dass bei allen Versuchen Material vom Gesamtgehirn verwendet wurde. Aus physiologischer Sicht ist zu erwarten, dass viele Unterschiede in begrenzten Gehirnabschnitten viel deutlicher zum Tragen kommen.

4.2 Microarray-Analyse bei TRESK-Knockout-Mäusen

Den Auftakt der Versuche nach Abschluss der Methodenentwicklung bildete die Durchführung eines Microarray-Versuches mit dem Ziel, die Unterschiede in der Genexpression bei einem Stamm von Knockout-Mäusen im Vergleich zu ihrem Wildtyp zu messen.

Die untersuchten Tiere waren Knockout-Tiere mit Funktionsverlust des Kaliumkanals *kcnk18* (TRESK – TWIK-related spinal cord K^+ channel), einem Zweiporendomänen-Kaliumkanal, der beim Menschen hauptsächlich im Rückenmark exprimiert wird [0302]. Zum Genexpressionsmuster in der Maus waren zum Zeitpunkt der Messungen kaum Informationen verfügbar. Allerdings gibt es einige Hinweise darauf, dass dieser Kanal bei der Maus in einer größeren Anzahl von Geweben exprimiert wird, wobei hier neben dem Rückenmark v.a. die Spinalganglien und das Gehirn zu erwähnen sind [0502]. Diese ersten Expressionsuntersuchungen wurden durch meine nachfolgenden Messergebnisse bestätigt.

Das „TRESK-Gen“ ist in den Knockout-Tieren durch eine Punktmutation ausgeschaltet worden, was zur Folge hatte, dass zwar weiterhin *kcnk18*-mRNA und TRESK-Protein gebildet werden kann, der resultierende Kanal aber seine Funktionalität verloren hat. Der TRESK-Knockout-Mausstamm ist auf den Inzuchtstamm C3H rückgekreuzt.

Die Tiere zeigten phänotypisch keine Auffälligkeiten, waren normal groß und zeigten normales Fortpflanzungsverhalten. Lediglich eine verminderte Aggression und verminderte generelle Aktivität konnten im Umgang mit den Tieren beobachtet werden, was in entsprechenden Verhaltensuntersuchungen zu verifizieren ist.

Das Ziel der Untersuchung und des Vergleiches der beiden Mäuse war die Darstellung der Kompensationsmechanismen, die in den Gehirnen der Knockout-Tiere stattfinden, um die Funktion des ausgeschalteten Zweiporendomänenkanals zu ersetzen. Keine andere Methode ist in der Lage, mit so wenig Aufwand alle erdenklichen Kaliumkanäle hinsichtlich ihrer Genexpression zu untersuchen und in so weit reichendem Ausmaß Informationen über Kompensationsmechanismen zu liefern.

4.2.1 Kompensation im Gehirn

Vergleich Maus 153 (TRESK-k.o.) und 162 (C3H-WT)

In einem ersten Versuch wurden acht Experimente durchgeführt. Dafür wurden die Gehirne der beiden genannten Tiere im Alter von ca. 8 Wochen (P56-P60) entnommen, die totalRNA

isoliert und im Microarray-Versuch eingesetzt. Ein Dye-Switch wurde durchgeführt, so dass in vier der acht Experimente der Wildtyp mit Cy5 markiert wurde und in den anderen vier Experimenten mit Cy3. Drei der Experimente zeigten leider einen stärkeren Hintergrund und waren qualitativ nicht mit den anderen Experimenten vergleichbar. Als Folge dessen wurden nur vier Experimente in die Endauswertung einbezogen, um nicht durch die Verwendung einer ungeraden Experimentanzahl einen Farbeffekt in die vergleichende Auswertung einzubeziehen.

In der Endauswertung spiegeln sich die Ergebnisse folgender Experimente wider:

| Slide | Slide-Charge | Hybridisierungsdatum | Cy3 | Cy5 |
|-------|--------------|----------------------|------------|------------|
| 21 | 03/2005 | 20.10.2005 | 153 (k.o.) | 162 (WT) |
| 23 | 03/2005 | 25.10.2005 | 153 (k.o.) | 162 (WT) |
| 24 | 03/2005 | 07.11.2005 | 162 (WT) | 153 (k.o.) |
| 25 | 03/2005 | 09.11.2005 | 162 (WT) | 153 (k.o.) |

Wie im Kapitel Datentransformation und Auswertung beschrieben, wurden die Datensätze jedes einzelnen Experimentes logarithmiert und nach Lowess normalisiert. Die Replikate wurden nicht zusammengefasst und es erfolgte auch keine Berechnung der relativen Genexpression. Aus der ersten Auswertung resultierten demnach pro Experiment zwei Datensätze, einer mit den Wildtyp-Intensitäten und einer mit den Knockout-Intensitäten. Dann wurden die Datensätze über eine Normalisierung auf die mittlere Intensität aller zu normalisierenden Datensätze direkt aufeinander angeglichen. Im Folgenden wurden der Mittelwert der Intensität sowie dessen Standardabweichung für alle Datensätze von Knockout und Wildtyp berechnet und die beiden resultierenden Datensätze miteinander durch Differenzbildung in Relation gesetzt (vgl. Kapitel 3.3).

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4-26 – 4-29) stellen die Ergebnisse nach wie gerade beschriebener Datentransformation dar.

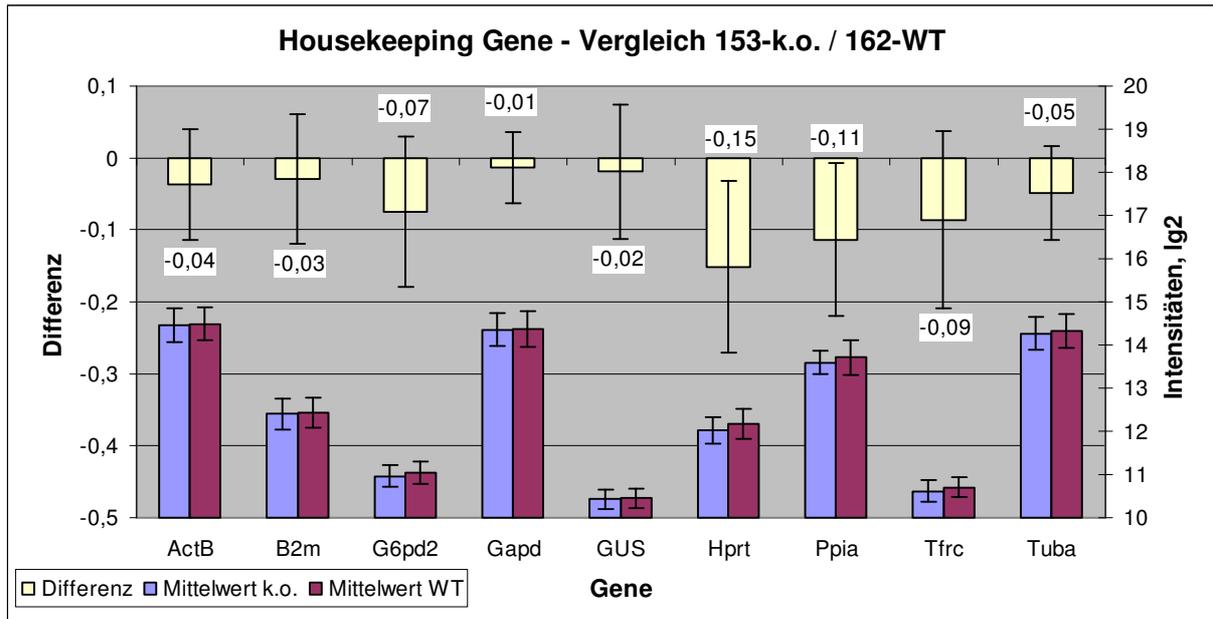


Abb. 4-26 Darstellung der Housekeeping Gene im Vergleich der Genexpression beim Mauspaar 153 (k.o.) und 162 (WT)

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme annähernd gleich alt und wurden unter denselben Bedingungen aufgezogen. Die Gene β -Aktin, GAPD, α -Tubulin und Ppia zeigten eine recht hohe Intensität und werden diesen Ergebnissen nach im Gehirn stark exprimiert. Wie zu Beginn beschrieben, sind diese Expressionswerte aufgrund der Funktion dieser Gene gut nachvollziehbar.

Keiner dieser internen Standards wies eine Differenz von über 0,2 im Betrag auf. 0,2 ist - wie im Kapitel Datentransformation beschrieben - eine willkürlich gewählte Grenze zur Datenfiltration. Sie wird auch in den weiteren Ergebnissen und Darstellungen zur Anwendung kommen. Wie aus der Abbildung ersichtlich zeigten die Housekeeping Gene keine Regulation. Dies war in Anbetracht der Eigenschaften und Auswahlkriterien der untersuchten Mäuse so zu erwarten.

Die folgende Abbildung (Abb. 4-27) zeigt die als reguliert resultierenden Gene im Vergleich der beiden Mäuse-Gehirne.

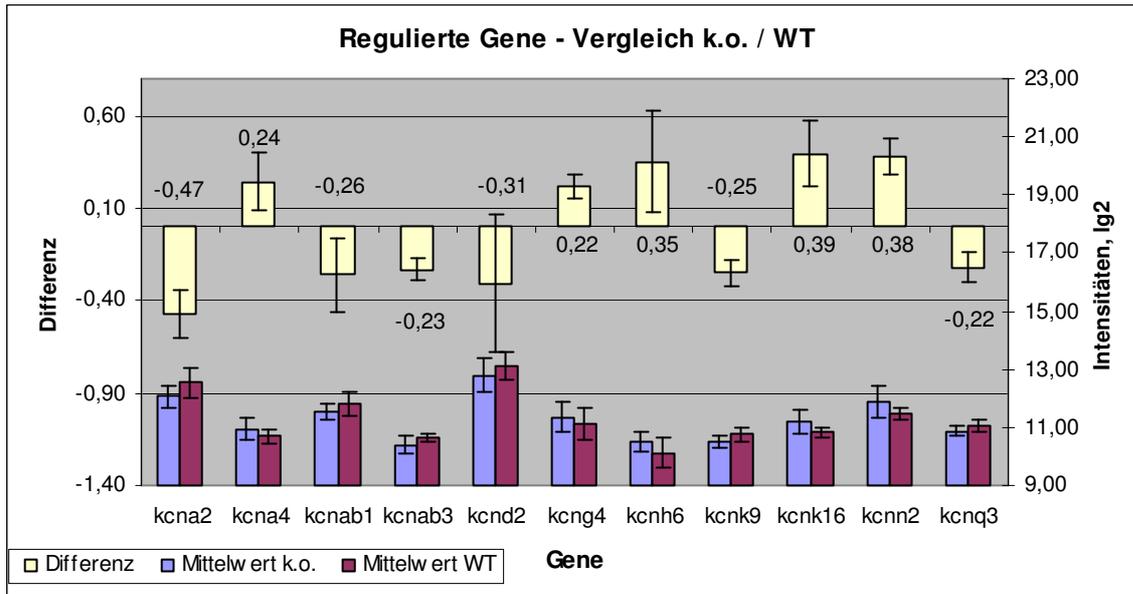


Abb. 4-27 Darstellung der Regulierten Gene im Vergleich der Genexpression beim Mauspaar 153 (k.o.) und 162 (WT)
Annahme der Regulation ab einem Differenzbetrag von $\geq 0,2$

Nur wenige Gene zeigten Regulation. Interessant ist hier vor allem, dass bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen und ihren entsprechenden β -Untereinheiten Regulationen auftraten (kcna2, kcna4, kcnab1, kcnab3, kcmd2, kcnh6, kcnq3). Auch der Calciumabhängige Kaliumkanal kcnk2 zeigte Hoch-Regulation, sowie der Modifier kcnq4.

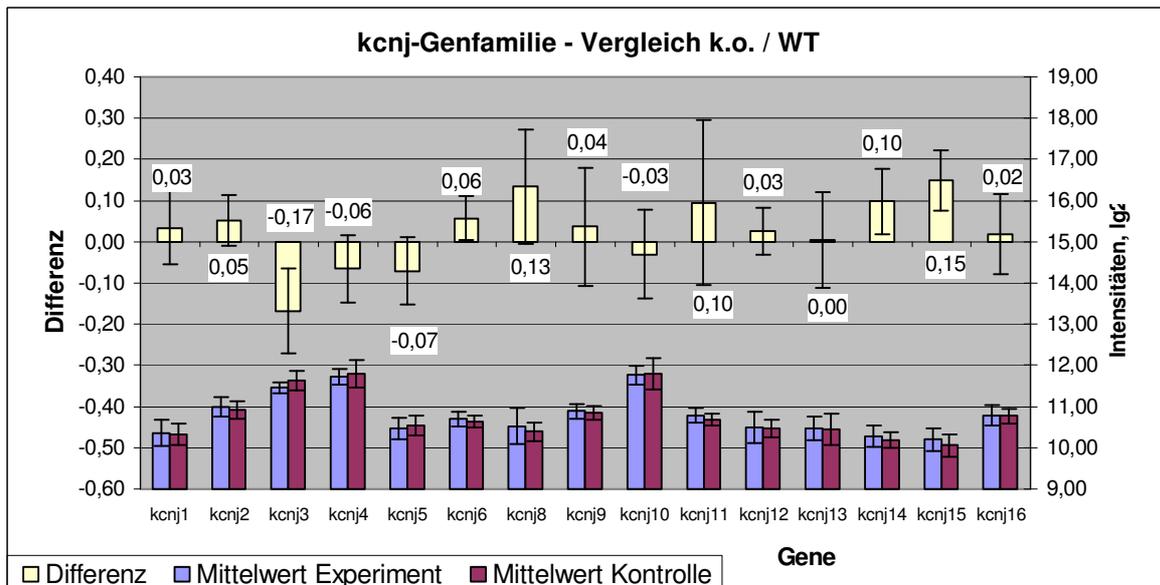


Abb. 4-28 Darstellung der Regulierten Gene im Vergleich der Genexpression beim Mauspaar 153 (k.o.) und 162 (WT)
Annahme der Regulation ab einem Differenzbetrag von $\geq 0,2$

Keiner der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle zeigte Regulation (Abb. 4-28). Zwei Gene erreichten Beträge von über 0,15, allerdings mit relativ hohen Standardabweichungen.

Aus der Familie der Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle zeigten zwei Gene Regulation. Zum einen *kcnk9* (TASK3) und zum anderen *kcnk16* (TALK). *Kcnk9* zeigte eine schwache Ab-Regulation mit einem Betrag von 0,25 mit einer sehr geringen Standardabweichung. Der Grund für diese verringerte Genexpression ist nicht leicht zu erklären. Da momentan die Verteilung der TRESK-Expression im Gehirn der Maus noch nicht abschließend mithilfe von histochemischen Untersuchungen geklärt wurde, ist es schwer möglich die TRESK- mit der TASK3-Expression in Beziehung zu setzen oder gegenseitige Wechselwirkungen zu erklären. Im Gegensatz zu *kcnk9* zeigte *kcnk16* eine Hoch-Regulation.

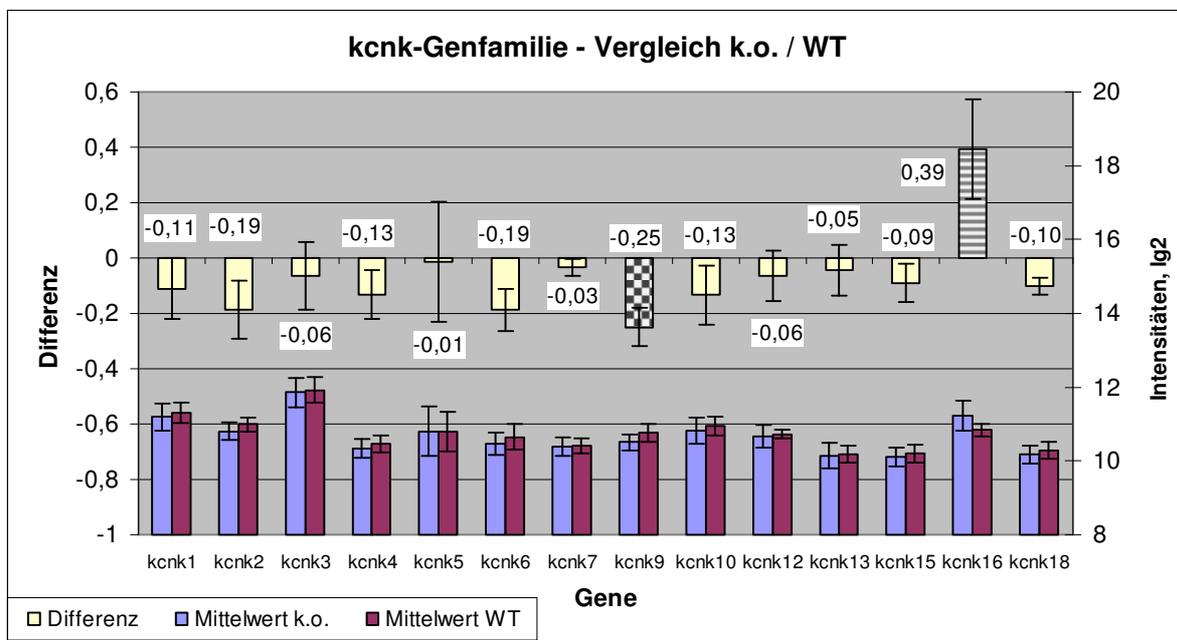


Abb. 4-29 Darstellung der Gene der *kcnk*-Genfamilie im Vergleich der Genexpression beim Mauspaar 153 (k.o.) und 162 (WT), Annahme der Regulation ab einem Differenzbetrag von $\geq 0,2$ kariert: Ab-Regulation, liniert: Hoch-Regulation.

Zur Genexpression von *kcnk16* in den verschiedenen Geweben des Organismus bei der Maus sind kaum Daten verfügbar. Der humane TALK1 wird hauptsächlich im Pankreas exprimiert und nur in sehr geringem Maße in anderem Gewebe [0303]. Außerdem gibt es beim Menschen einen weiteren TALK-Kaliumkanal – TALK2. Diesen Kanal gibt es bei der Maus nicht. Eine ähnliche Sequenz kann man zwar in Homologie-Untersuchungen ausmachen, allerdings liegt diese geteilt auf zwei verschiedenen Chromosomen, so dass man von einem Chromosomenbruch ausgehen muss, durch den Ratte und Maus diesen Kaliumkanal nicht

mehr exprimieren können. Der auch in der Maus exprimierte TALK1 scheint meinen Messungen zufolge dagegen nicht nur in der Pankreas, sondern auch in anderen Geweben, wie auch im Gehirn exprimiert zu werden.

Da die TRESK-Knockout-Tiere keinerlei phänotypischen Merkmale zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass der Kanal entweder keine lebenswichtige oder vordergründige Funktion einnimmt und ein Ausfallen deshalb ohne Auswirkungen bleiben kann oder dass ein anderer Kanal die Funktion übernimmt und damit den Ausfall kompensiert. Meine Experimente geben den Hinweis darauf, dass TALK(1) ein Zweiporendomänen-Kaliumkanal sein könnte, der die Funktionen des fehlenden TRESK-Kanals übernimmt. Mit großer Sicherheit kann es entsprechend der Messergebnisse keiner der anderen Zweiporendomänen-Kaliumkanäle sein, eine Beteiligung der übrigen Kaliumkanäle an der Kompensation ist jedoch nicht auszuschließen. Sicherlich kann durch diese Experimente nicht abschließend geklärt werden, ob in diesem Fall eine echte Kompensation auftritt, d.h. eine Übernahme der Funktion eintritt. Die Hoch-Regulation eines einzelnen anderen Zweiporendomänenkanals legt die Schlussfolgerung allerdings nahe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die erste Untersuchung der Knockout-Mauslinie mit ihrem Wildtyp weitgehend konsistente Ergebnisse erbrachte. Bei den Housekeeping Genen fand wie zu erwarten keine Regulation statt, bei den meisten Kaliumkanälen ebenfalls nicht. Lediglich einige spannungsabhängige Kaliumkanäle und der Zweiporendomänen Kaliumkanal *kcnk16* zeigen sich unter den untersuchten Genen hochreguliert und könnten daher eventuell für die Kompensation des Funktionsverlustes von TRESK1 verantwortlich sein. Dieses erste Ergebnis spiegelt natürlich nur die Verhältnisse für ein Mauspaar wieder und sollte durch weitere Messungen vor allem unter biologischer Replikation, d.h. unter Einsatz einer größeren Tierzahl, überprüft und bestätigt werden.

Vergleich der Knockout-Tiere 171/172 mit den Wildtyp-Tieren 203/204

Nach Abschluss der zuvor beschriebenen Messungen zum Mauspaar 162/153 wurde ein weiterer Microarray-Versuch durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren keine genau gleichaltrigen Tiere verfügbar, sondern nur zwei ca. 6 Monate alte Knockout-Tiere (171/172) und zwei mit ca. 2 Monaten deutlich jüngere Wildtyp-Tiere (203/204). Diese Tiere wurden für den Versuch eingesetzt, weil angenommen wurde, dass diese adulten Tiere sich hinsichtlich der Genexpression nicht mehr relevant unterscheiden. Als adult werden Mäuse ab einem Alter von 8 Wochen angesehen, da sie zu diesem Zeitpunkt ausgewachsen und fortpflanzungsfähig sind. Dass bei jüngeren Tieren im Vergleich zu adulten Tieren

Unterschiede bestehen, hat gerade der Microarray wie zuvor beschrieben ja eindrucksvoll nachweisen können (vgl. Kapitel 4.1). Dieser hier durchgeführte Microarray-Versuch zeigte, dass auch bei verschieden alten Tieren mit einem Alter über 8 Wochen eine altersspezifische Genexpression erhalten bleibt.

Nach Durchführung von vier Experimenten wurde die Versuchsreihe deshalb abgebrochen. Hinsichtlich der Untersuchung und des Vergleiches von TRESK-Knockout und Wildtyp brachten die vier Experimente keine neuen Erkenntnisse, allerdings zeigen sie die Reproduzierbarkeit und die Ähnlichkeit in der Genexpression der Einzeltiere.

Die folgende Tabelle zeigt die durchgeführten Experimente:

| Slide | Slide-Charge | Hybridisierungsdatum | Cy3 | Cy5 |
|-------|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 29 | 03/2005 | 06.12.2005 | 171 (k.o., 6 Monate) | 203 (WT, 2 Monate) |
| 30 | 03/2005 | 06.12.2005 | 203 (WT, 2 Monate) | 171 (k.o., 6 Monate) |
| 31 | 03/2005 | 06.12.2005 | 172 (k.o., 6 Monate) | 204 (WT, 2 Monate) |
| 32 | 03/2005 | 06.12.2005 | 204 (WT, 2 Monate) | 172 (k.o., 6 Monate) |

Unter Durchführung des Dye-Switch wurden zum einen die Mäuse 171 und 203 und zum anderen die Mäuse 172 und 204 miteinander verglichen.

Für beide Mauspaare ergab sich das gleiche Ergebnis. Wenn man bedenkt, dass jeweils zwei verschiedene Tiere eingesetzt wurden und dass die Microarray-Ergebnisse einer ungefähren Variabilität von ca. 10% unterliegen (vergleiche Kapitel „Datentransformation“), so zeigt die gemessene Ähnlichkeit, wie genau und reproduzierbar die von mir entwickelte Methode arbeitet.

Die Werte wurden entsprechend den Vorgaben in „Datentransformation“ ausgewertet und die beiden pro Mauspaar durchgeführten Experimente direkt miteinander verrechnet, um Dye-Switch-Effekte zu eliminieren.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4-30 – 4-33) zeigen beide Differenzbetrag-Balken für die Mauspaare.

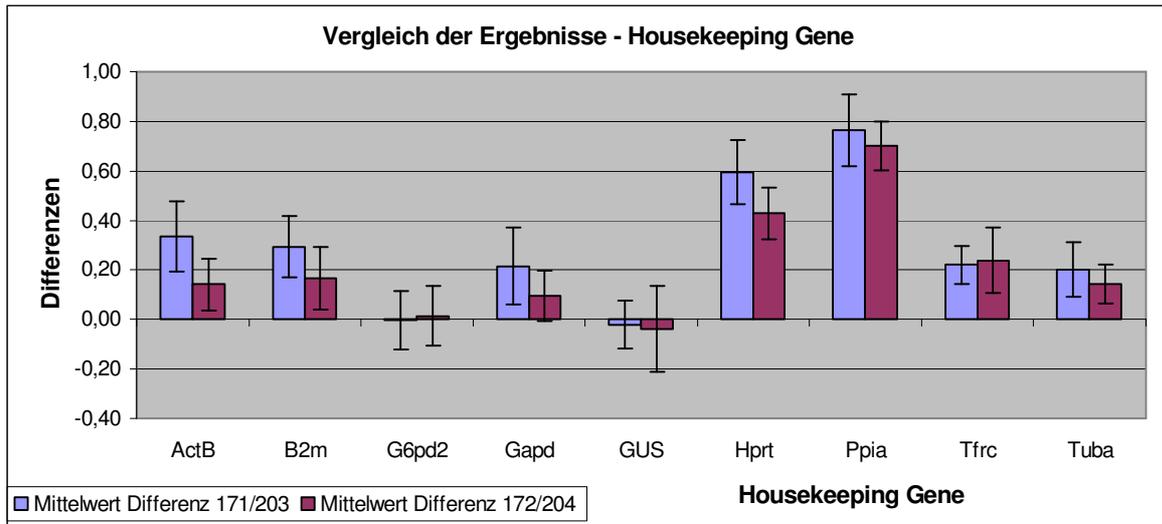


Abb. 4-30 Darstellung der Housekeeping Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Mauspaare 171/203 und 172/204

Die Differenzbeträge beim Mauspaar 172/204 sind in den meisten Fällen etwas kleiner als beim anderen Mauspaar. Aufgrund der Regelmäßigkeit der Abweichungen könnte dies auf einen Messeffekt zurückzuführen sein, der im Rahmen der Normalisierung die Betragshöhe beeinflusst.

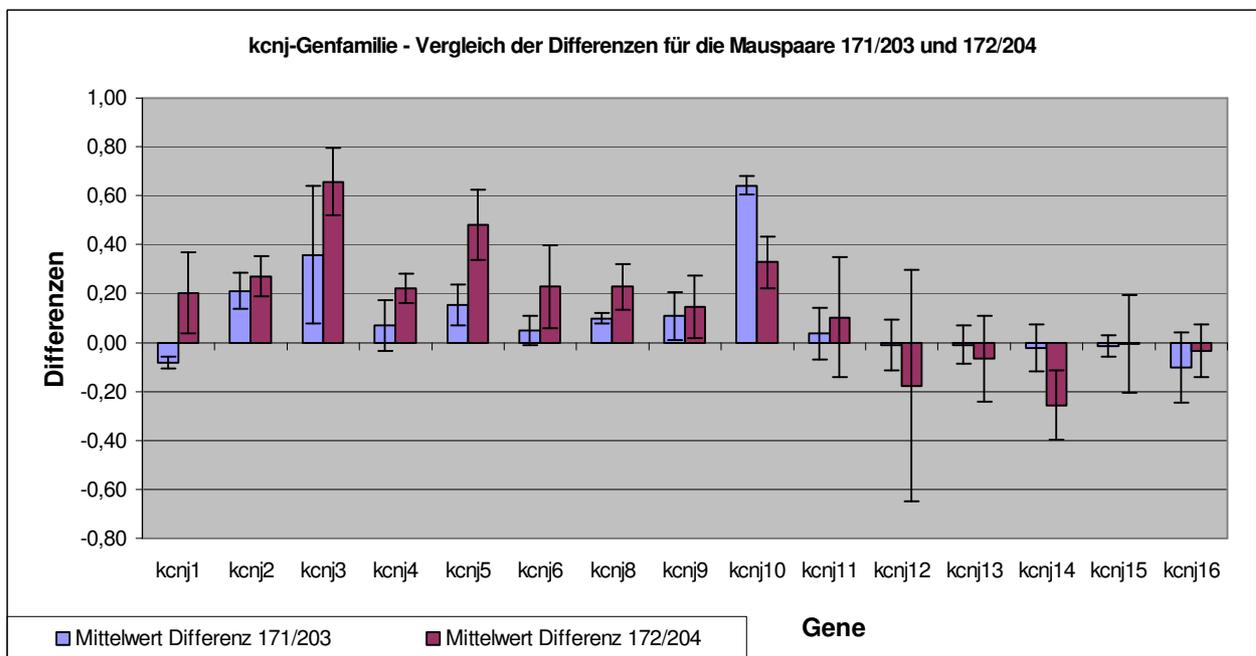


Abb. 4-31 Darstellung der kcnj-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Mauspaare 171/203 und 172/204

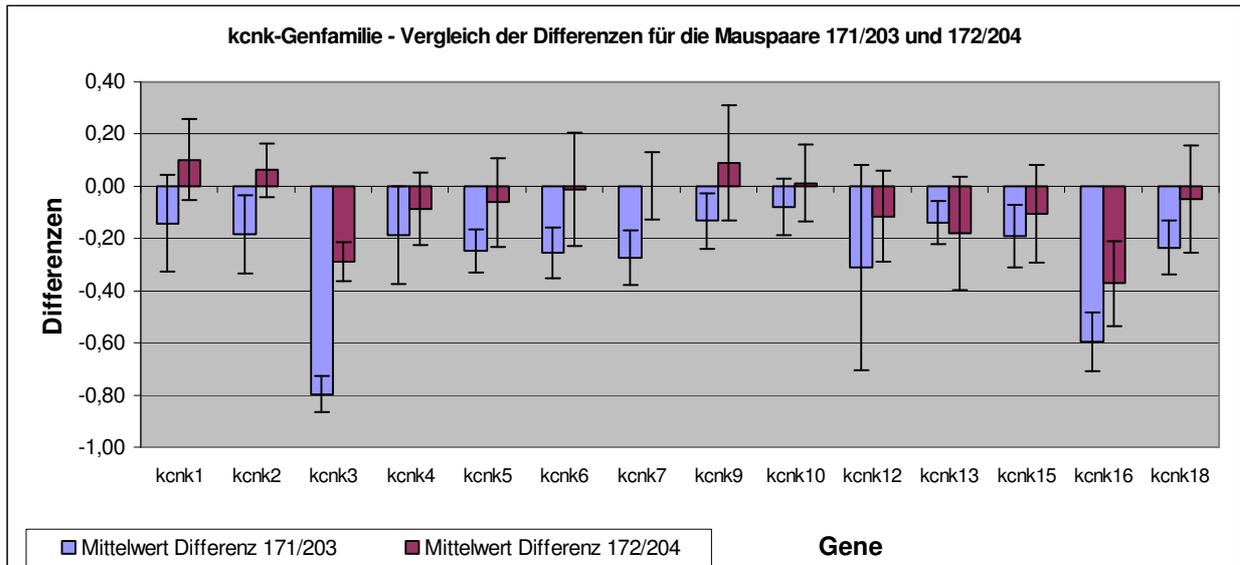


Abb. 4-32 Darstellung der *kcnk*-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Mauspaare 171/203 und 172/204

Auch bei den Genen der *knj*- und *kcnk*-Genfamilien zeigen sich die gleichen Tendenzen, wenn auch die Betragswerte etwas unterschiedlicher ausfallen.

Die folgende Abbildung (Abb. 4-33) zeigt die bei den beiden Versuchspaaren als reguliert auftretenden Gene. Wie bei den Housekeeping Genen ist der Differenzbetrag bei diesen Genen beim zweiten Mauspaar (172/204) etwas geringer. Dennoch stimmt die Tendenz bei allen Werten überein.

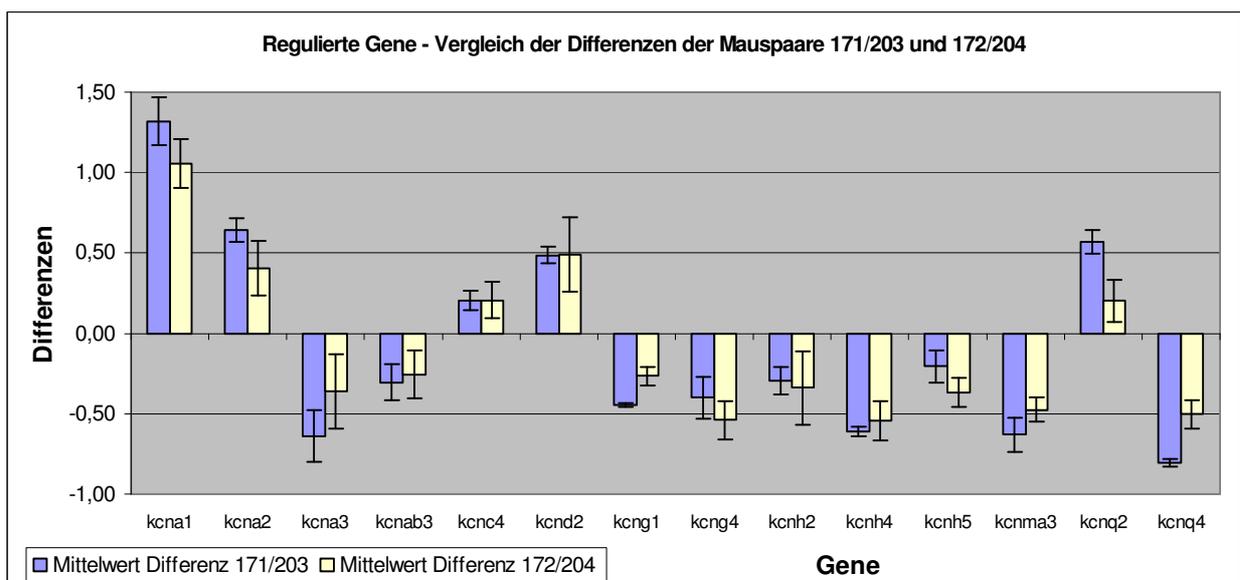


Abb. 4-33 Darstellung der als reguliert auftretenden Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Mauspaare 171/203 und 172/204

Dieser im ersten Anblick fehlgeschlagene Versuch hat letztendlich die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der neu etablierten Methode bewiesen.

Die gezeigten Daten wurden ebenfalls entsprechend dem bei den anderen Versuchen verwendeten Auswertungsprotokoll zusammengefasst. Es sind zwar deutliche Regulationen nachzuweisen, deren Ursprung jedoch nicht eindeutig ist: Er kann sowohl im Knockout des TRESK-Kanals liegen, als auch im Altersunterschied der Tiere. Deshalb werden die Daten hier bewusst nicht weiter dargestellt.

Ein Vergleich mit den in Kapitel 4.1 vorgestellten Daten zur altersspezifischen Genexpression bei Jungtieren zeigte keinerlei Übereinstimmungen. Dies ist allerdings verständlich, wenn man bedenkt, dass Mäuse eines anderen Wildtypstammes und einer anderen Altersstruktur eingesetzt wurden.

Ergebnisse weiterer Messungen zum Vergleich TRESK-Knockout- mit Wildtyp-Gehirn

Wie im Kapitel Datentransformation und Auswertung beschrieben, wurde die Methode aufgrund eines Wechsels bei Slideauswahl und Spottingverfahren nach den ersten zwei Chargen umgestellt und es erfolgte eine Anpassung auf die nun veränderten Anforderungen an die Versuchsbedingungen. Die Chipsequenzen wurden dabei nicht verändert. Lediglich die Verfahren beim Prähybridisieren, Hybridisieren und Waschen waren betroffen.

Im Zuge dieser Anpassungen wurden einige Experimente durchgeführt, die die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Kompensation im Mausgesamtgehirn bei TRESK-k.o.-Mäusen im Vergleich zu ihrem Wildtyp bestätigen sollten.

In der Endauswertung spiegeln sich die Ergebnisse folgender Experimente wieder:

| Slide | Slide-Charge | Hybridisierungsdatum | Cy3 | Cy5 |
|-------|--------------|----------------------|------------|------------|
| 4 | 05/2006 | 20.05.2006 | 315 - WT | 339 - k.o. |
| 6 | 05/2006 | 29.05.2006 | 339 - k.o. | 315 - WT |
| 8 | 05/2006 | 07.06.2006 | 203 - WT | 230 - k.o. |
| 11 | 05/2006 | 08.06.2006 | 231 - k.o. | 203 - WT |

Wie bei den zuvor gezeigten Auswertungen wurden auch hier die einzelnen Datensätze zur Basis 2 logarithmiert, nach Lowess normalisiert und dann über eine Angleichung der mittleren Intensität aufeinander angeglichen.

Wie schon im Kapitel Datentransformation angedeutet, bestätigen die mit dieser neuen Slidecharge ermittelten Ergebnisse größtenteils die zuvor ermittelten Kompensationsdaten zum TRESK-k.o.-Mausstamm.

Bei der verwendeten RNA handelt es sich um totalRNA von Gesamtgehirnen ca. 8 Wochen alter Mäusemännchen (50-60 Tage alt). Demnach wurde mit diesem Datensatz auch der Anspruch erfüllt, eine biologische Replikation (vgl. Kapitel 3.1.3) durchzuführen, nachdem im ersten großen Datensatz (Mäuse 153 / 162) vor allem die technische Replikation (vgl. Kapitel 3.1.3) im Vordergrund stand. Der jetzt durchgeführte Versuch mit anderen Tieren zeigt, dass es sich bei den gemessenen Kompensationswerten des ersten Versuches nicht nur um individuelle Ergebnisse handelt, sondern ein großer Teil der Ergebnisse reproduzierbar und damit auf den gesamten Mausstamm zu übertragen sind.

Wie zu erwarten und bei der Messung für das Mauspaar 153/162 beobachtet, zeigen sich bei den Housekeeping Genen keinerlei Regulationen (Abb. 4-34). Aufgrund der erfüllten Bedingungen hinsichtlich Auswahl von zum Knockout-Stamm passenden Wildtyp (vgl. Kapitel 3.1.3) ist dieses Ergebnis nachvollziehbar. Lediglich G6pd2 zeigt mit $-0,28$ einen kleinen Ab-Regulations-Betrag, der aber aufgrund der sehr hohen Standardabweichungen, sowohl bei der Differenz an sich als auch bei den Intensitäten, nicht valide ist.

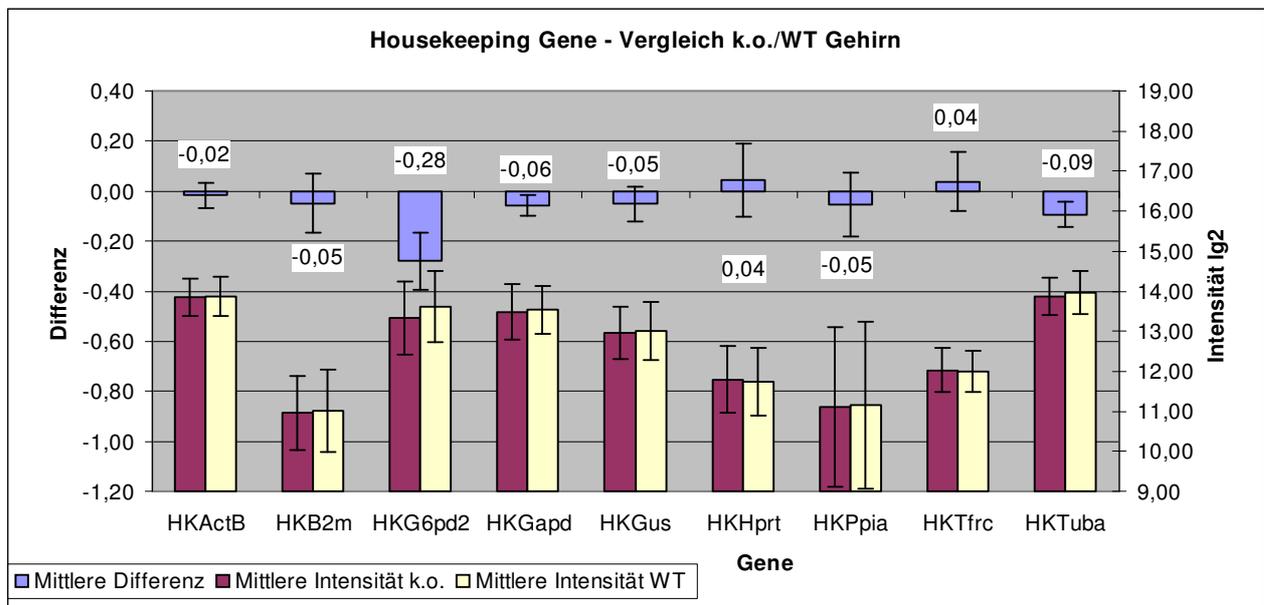


Abb. 4-34 Kompensation im Gehirn

Darstellung der **Housekeeping Gene** im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze **TRESK-k.o.-Mäusen zu passendem Wildtyp**

Die folgende Abbildung (Abb. 4-35) zeigt die Gene, die, nach Endauswertung der 4 Experimente, relative Differenzbeträge von über 0,2 zeigten. Wie in der Abbildung zu erkennen, sind die Standardabweichungen sowohl bei den Intensitäten wie auch beim Differenzbetrag sehr hoch.

Die Ursache liegt zum einen im Methodenwechsel und den damit verbundenen Änderungen in den Versuchsbedingungen. Die Veränderungen im molekularbiologischen Teil bedingen letztendlich die Überarbeitung im Bereich Auswertung, da wie zu Anfang beschrieben, die Microarray-Technologie immer eine Verknüpfung aus Molekularbiologie und Datentransformation darstellt. Um die Vergleichbarkeit aller Datensätze zu erhalten, wurde die Auswertung bei diesem Versuch daher nach der zuvor verwendeten Methode durchgeführt. Nach Festlegung auf eine Methode – sei es molekularbiologisch als auch rechnerisch – sollte entsprechend diesen Beobachtungen auf einen Verfahrenswechsel und sei er auch noch so gering mit Überarbeitung des gesamten Versuchsweges reagiert werden.

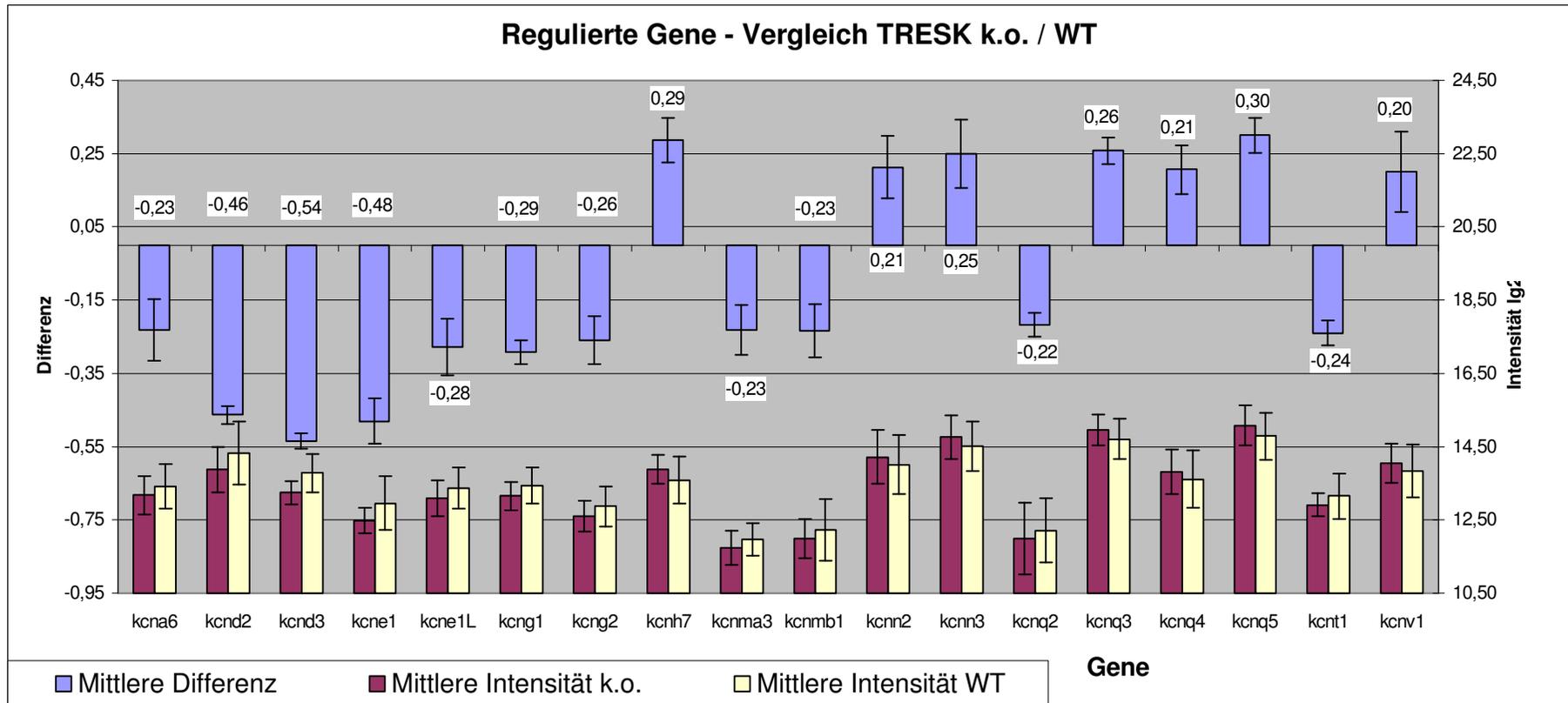


Abb. 4-35 Kompensation im Gehirn

Darstellung der **Regulierten Gene** im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze **TRESK-k.o. und passender Wildtyp**

Zum anderen muss bedacht werden, dass in diesem Datensatz 4 verschiedene Tiere zum Einsatz kamen, so dass mehr individuelle Genexpressionsunterschiede in das Ergebnis einfließen als beim zuerst gemessenen „Mauspaar“ 153 / 162. Dementsprechend ist die mit der Anzahl der Tiere wachsende Standardabweichung verständlich. Hier sei noch einmal daran erinnert, dass es aufgrund der fünffachen Replikation auf dem Microarray möglich ist, in jedem Experiment Mittelwert und Standardabweichung zu berechnen. Bei mehreren Experimenten steigt die n-Zahl dementsprechend von 5 auf 10 usw. an.

Hinsichtlich der Messung der Kompensationsmechanismen in TRESK-Knockout-Mäusen im Vergleich zu ihrem Wildtyp können die Daten demnach auch mit höheren Standardabweichungen herangezogen werden. Größtenteils entsprechen die Ergebnisse den zuvor gemessenen Ergebnissen des ersten Mauspaars.

Die Ergebnisse zu den beiden Familien der Einwärtsgleichrichter und Zweiporen-Domänen-Kaliumkanäle sind im Folgenden dargestellt.

Dabei zeigt Abb. 4-36 die Regulationswerte bei den Einwärtsgleichrichtern – *kcnj*-Familie. Drei Gene sind entsprechend ihren Intensitätsdaten Kandidaten für weitere Untersuchungen: *kcnj3* (GIRK1), *kcnj8* und *kcnj16*.

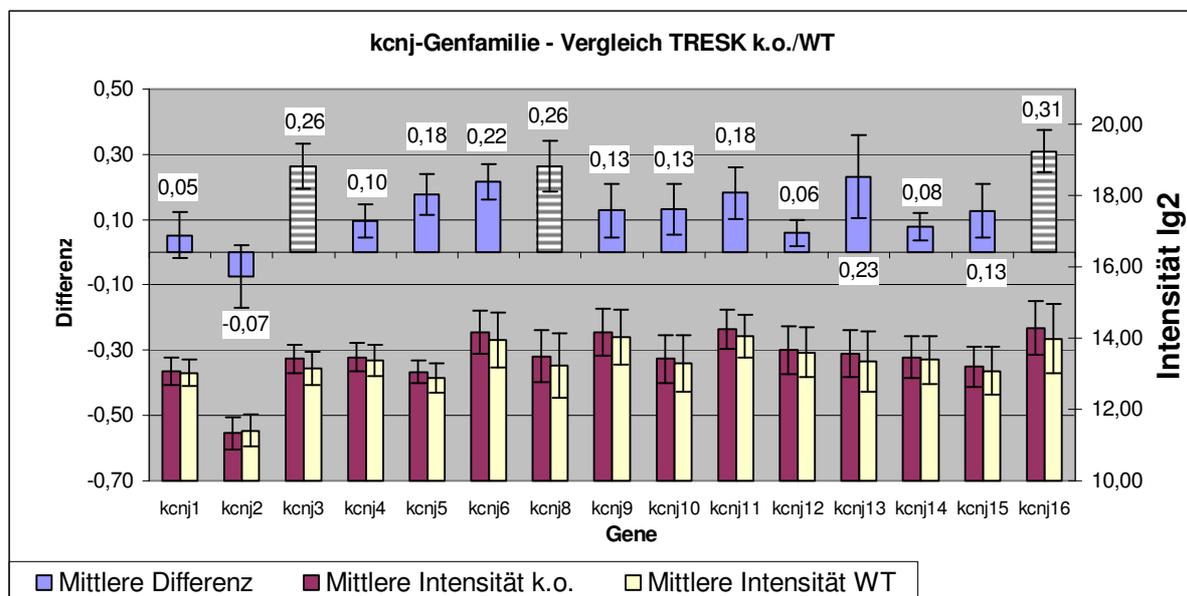


Abb. 4-36 Kompensation im Gehirn

Darstellung der *kcnj*-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o. und passender WT

Kcnj3 codiert einen G-Protein-gekoppelten Kaliumkanal, der vor allem bei der Hyperpolarisation des Membranpotentials eine wichtige Rolle spielt. Kcnj8 ist ein universell exprimierter Kaliumkanal, der vor allem in Assoziation mit SUR1 und SUR2A/B genannt werden muss. Inwiefern seine Hochregulation mit dem Knockout des TRESK-Kanals in Verbindung steht, lässt sich nicht einfach erklären. Dazu wird ein genauere Einblick in die Zellstoffwechselfvorgänge nötig sein, an denen Kaliumkanäle beteiligt sind. Auch für die Bedeutung und Funktion von kcnj16 sind zu wenige Daten verfügbar, um die Ergebnisse in einen geeigneten Kontext zu stellen.

Aufgrund der Tatsache allerdings, dass keines dieser drei Gene beim ersten gemessenen Mauspaar 153/162 als reguliert gemessen wurde, ist das Ergebnis für die kcnj-Kanäle insgesamt mit Vorsicht zu bewerten. Dabei darf aber auch nicht außer Acht gelassen werden, dass der Einsatz biologischer Replikation zur Erhöhung der Standardabweichungen führen muss, da in jedem Experiment Individuen zu Einsatz kommen, die ihren individuellen Genstatus mitbringen.

Abb. 4-37 zeigt die Messergebnisse für die kcnk-Genfamilie. Auch hier sieht das Bild zum Teil ähnlich aus, wie bei dem ersten Mauspaar, aber es zeigen sich auch Unterschiede. Bei Mauspaar 153 / 162 zeigte sich nur sehr wenig Regulation.

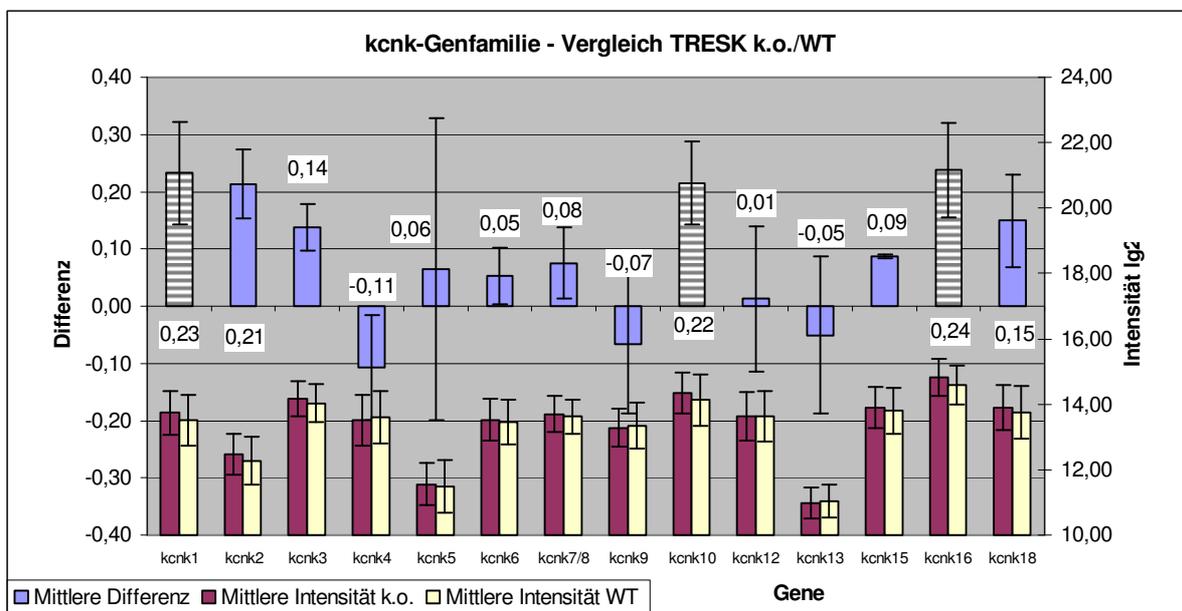


Abb. 4-37 Kompensation im Gehirn

Darstellung der **kcnk-Gene** im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze **TRESK-k.o. und passender WT**

Einzig *kcnk16* zeigte sich aufgrund einer deutlichen Hoch-Regulation als Kandidat für einen möglichen Kompensationsmechanismus. Im neuen Datensatz ist dieses Ergebnis in gleicher Form wieder zu beobachten (Abb. 4-37). Der Schluss liegt nahe, dass dieses Gen tatsächlich den Funktionsverlust von TRESK kompensieren könnte.

Zusätzlich zeigte sich Hoch-Regulation bei *kcnk1* (TWIK1) und *kcnk10* (TREK2). Beide Kanäle sind hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion noch nicht hinreichend erforscht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Umstellung der Methode erfolgreich verlaufen ist. Einige Anlaufschwierigkeiten und vor allem die etwas höheren Standardabweichungen, die aber nicht nur auf die methodischen Veränderungen sondern auch auf die biologische Replikation zurückzuführen sein können, mindern die Vorteile der verbesserten Reproduzierbarkeit, der zufälligen Spotanordnung, was die Ausprägung systematischer Fehler minimiert, und der verbesserten Methodendurchführung nicht.

Was die Ergebnisse an sich angeht, so haben sich einige Kandidaten herausarbeiten lassen, deren genaue Genexpressionsmuster nun näher zu untersuchen sind. Dazu gehören neben einigen *kcna*-Kanälen, *kcnk16* und *kcnk2* vor allem Gene der Gruppen *kcnq*, *kcnh* und *kcng*.

4.2.2 Kompensation im Rückenmark

Nach Abschluss der Messungen am Gehirn wurde die Microarray-Technologie außerdem eingesetzt, um mögliche Kompensationsmechanismen, die sich bei den TRESK-Knockout-Tieren im Rückenmark abspielen, zu untersuchen.

Wie zuvor erwähnt, wird *kcnk16* (TRESK) beim Menschen hauptsächlich in den beiden Kompartimenten Rückenmark und Spinalganglien exprimiert, während er bei der Maus auch im Gehirn auftritt [0302, 0502]. Deshalb wurden wie im Folgenden beschrieben auch diese beiden Gewebe bei der Maus untersucht. Eingesetzt wurden die gleichen Tiere wie zuvor bei der Messung von Gehirn-RNA (vgl. Kapitel 4.2.1). Nach der Tötung der Tiere durch Genickschnitt wurde so gut wie möglich das gesamte Rückenmark heraus präpariert.

In der Endauswertung spiegeln sich die Ergebnisse folgender Experimente wider:

| Slide | Slide-Charge | Hybridisierungsdatum | Cy3 | Cy5 |
|-------|--------------|----------------------|------------|------------|
| 12 | 05/2006 | 20.06.2006 | 203 - WT | 230 - k.o. |
| 13 | 05/2006 | 20.06.2006 | 340 - k.o. | 203 - WT |
| 14 | 05/2006 | 21.06.2006 | 230 - k.o. | 315 - WT |
| 15 | 05/2006 | 21.06.2006 | 315 - WT | 340 - k.o. |

Zur Durchführung der Messungen mit Rückenmark-totalRNA wurde eine etwas andere Farbstoff-Markierungs-Strategie angewendet, die es über einen Amplifizierungsschritt ermöglicht, mit weitaus geringeren RNA-Mengen auszukommen (vgl. Kapitel 7). Nachteilig an einem solchen zusätzlichen Schritt ist natürlich das Auftreten zusätzlicher Fehlerquellen. Deshalb wurde diese Methode nur bei Rückenmark- und Spinalganglien-RNA angewendet, wo sehr wenig RNA aus der Präparation zu gewinnen war. Bei der Messung von Gehirn-RNA konnte darauf verzichtet werden.

In Abb. 4-38 sind die Ergebnisse für die Housekeeping Gene im Rückenmark im Vergleich von Knockout zu Wildtyp dargestellt.

Anders als im Gehirn zeigen sich im Rückenmark bei zwei Housekeeping Genen geringe Unterschiede in der Expression. Betroffen davon sind G6pd2 und Gus, wobei beide beim Knockout-Stamm Ab-Regulation zeigen. Da mit dem Knockout des TRESK-Gens kein direkter Zusammenhang zu ziehen ist, kann dieses Ergebnis momentan nicht erklärt werden. Es wäre aber sicherlich interessant, die Regulation in weiteren Versuchen zu klären.

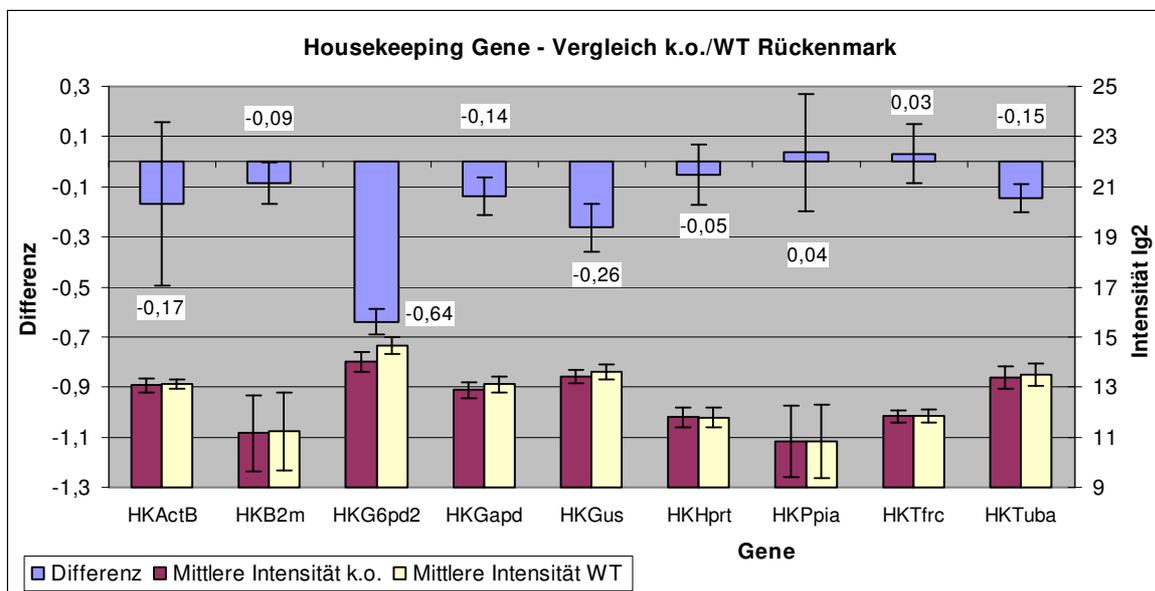


Abb. 4-38 Kompensation im Rückenmark

Darstellung der **Housekeeping Gene** im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o.-Mäusen zu passendem Wildtyp

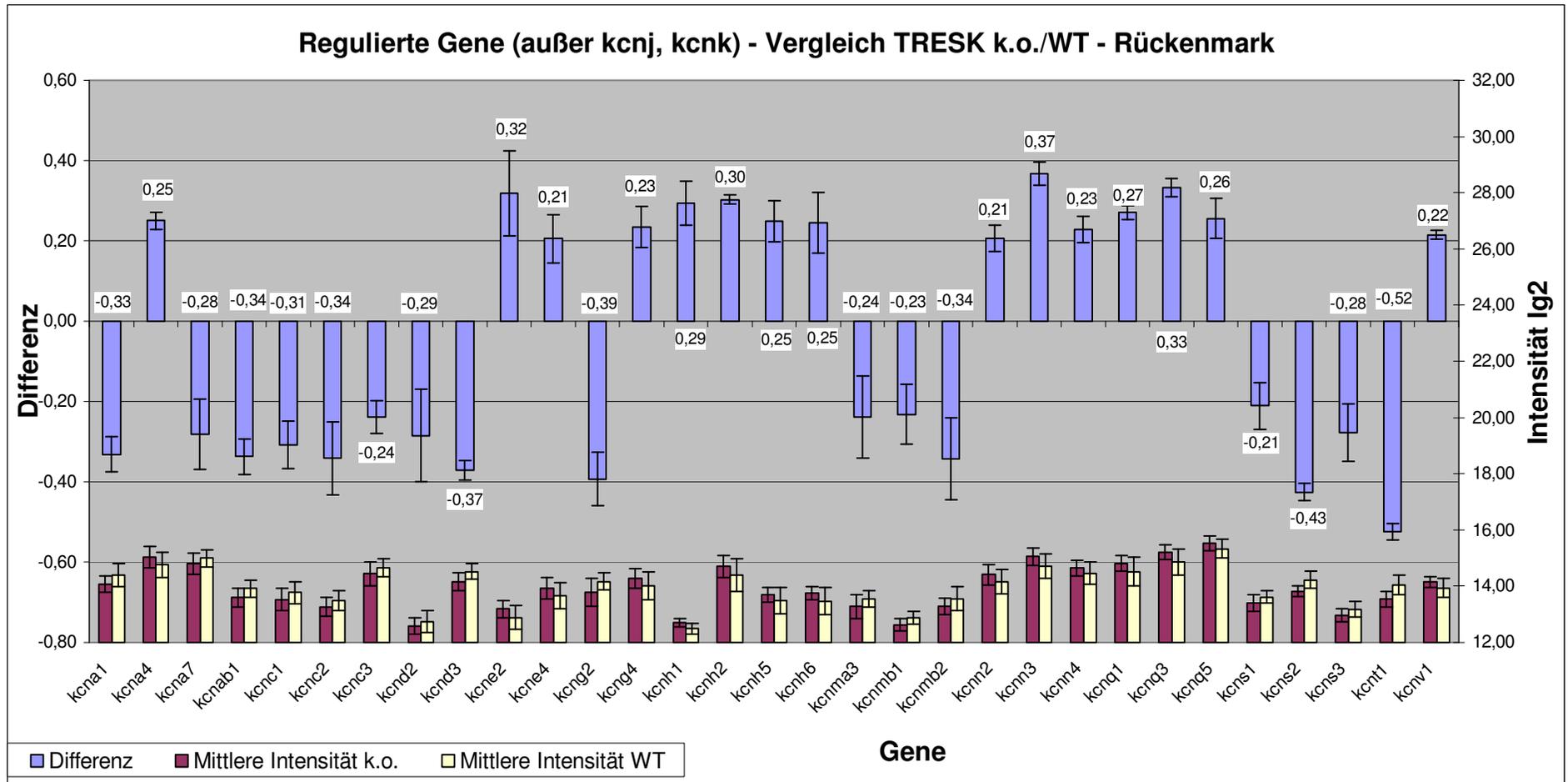


Abb. 4-39 Kompensation im Rückenmark
 Darstellung der **Regulierten Gene** im Vergleich der Genexpression
 Der beiden Gesamtdatensätze **TRESK-k.o. und passender Wildtyp**

In Abbildung 4-39 sind die Regulierten Gene der Messung dargestellt, welche einen Regulationsbetrag von 0,2 überschritten haben. Die Gene der Familien *kcj* und *kcnc* sind in späteren Abbildungen einzeln dargestellt und werden auch dort besprochen.

Wie aus der Abbildung ersichtlich zeigen weitaus mehr Gene hohe Differenzbeträge und sind damit als reguliert einzustufen als im Gehirn der Mäuse.

Interessanterweise zeigen sich aber die gleichen Gene auch wieder als reguliert und zwar in „die gleiche Richtung“ wie beim Vergleich der Gehirn-RNA. Bedenkt man die Tatsache, dass bei den Messergebnissen zum Gehirn auch noch ein Methodenwechsel Einfluss nimmt, so sind die Übereinstimmungen erstaunlich.

In Tab.4-1 sind wie eben beschrieben alle Gene aufgeführt, die in beiden Versuchen zu den Expressionsunterschieden in Gehirn und Rückenmark gleichartige Regulation zeigten. Die Richtung der Regulation wird mit Pfeilen nach oben oder unten dargestellt und die Höhe der Intensitätswerte wird über einen Filter in die drei Klassen „niedrig“, „mittel“ und „hoch“ eingeteilt, um einen Eindruck zur generellen Expression der Gene vermitteln zu können.

| Gen | Regulation | Intensität - Gehirn | Intensität - Rückenmark |
|--------------|------------|---------------------|-------------------------|
| <i>kcna4</i> | ↑ | mittel | hoch |
| <i>kcd2</i> | ↓ | hoch | niedrig |
| <i>kcd3</i> | ↓ | niedrig | mittel |
| <i>kcng2</i> | ↓ | mittel | mittel |
| <i>kcng4</i> | ↑ | mittel | mittel |
| <i>kcnh6</i> | ↑ | niedrig | mittel |
| <i>kenn2</i> | ↑ | mittel-hoch | mittel-hoch |
| <i>kenn3</i> | ↑ | hoch | hoch |
| <i>kcq3</i> | ↓ | mittel-hoch | hoch |
| <i>kcq5</i> | ↑ | hoch | hoch |
| <i>kcna3</i> | ↓ | niedrig | mittel |
| <i>kcmb1</i> | ↓ | niedrig | niedrig |
| <i>kcnt1</i> | ↓ | mittel | mittel |
| <i>kcnv1</i> | ↑ | mittel | mittel |

Tab.4-1 Zusammenfassung der „regulierten Gene“ der Ergebnisse aus dem Genexpressionsvergleich bei Gehirn und Rückenmark

Wie oben beschrieben, zeigten sich in den beiden Versuchen zu den Genexpressionsunterschieden im Gehirn nur zum Teil gleiche Ergebnisse. Aufgrund individueller Unterschiede waren einige Gene nicht in beiden Ergebnislisten vorhanden. Einige Gene wiesen jedoch in allen Versuchen Regulation auf. Aus dem Vergleich von Gehirn und Rückenmark resultierten aus der Gruppe der „übrigen“ Kaliumkanäle – ohne die Genfamilien der *kcnj*- und *kcnk*-Kanäle - drei wichtige Kandidaten, die in beiden Kompartimenten reguliert waren: *kcmd2*, *kcnk2* und *kcnq3*. Diese sind in weiteren Untersuchungen zu überprüfen.

Wie bei den spannungsabhängigen und Calcium-gesteuerten Kaliumkanälen zeigte sich im Rückenmark auch in der *kcnj*-Gen-Familie deutliche Veränderungen in der Genexpression sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch in den Beträgen. Legt man ähnlich stringente Maßstäbe an, wie bei den Gehirndaten, sind die Gene *kcnj3* (GIRK1) und *kcnj5* (GIRK4) als reguliert aufzuführen. Weitet man die Filter ein wenig, um der biologischen Replikation und den damit verbundenen etwas höheren Standardabweichungen Rechnung zu tragen, so sind zusätzlich noch *kcnj1*, *kcnj6*, *kcnj8*, *kcnj11* und *kcnj16* zu nennen.

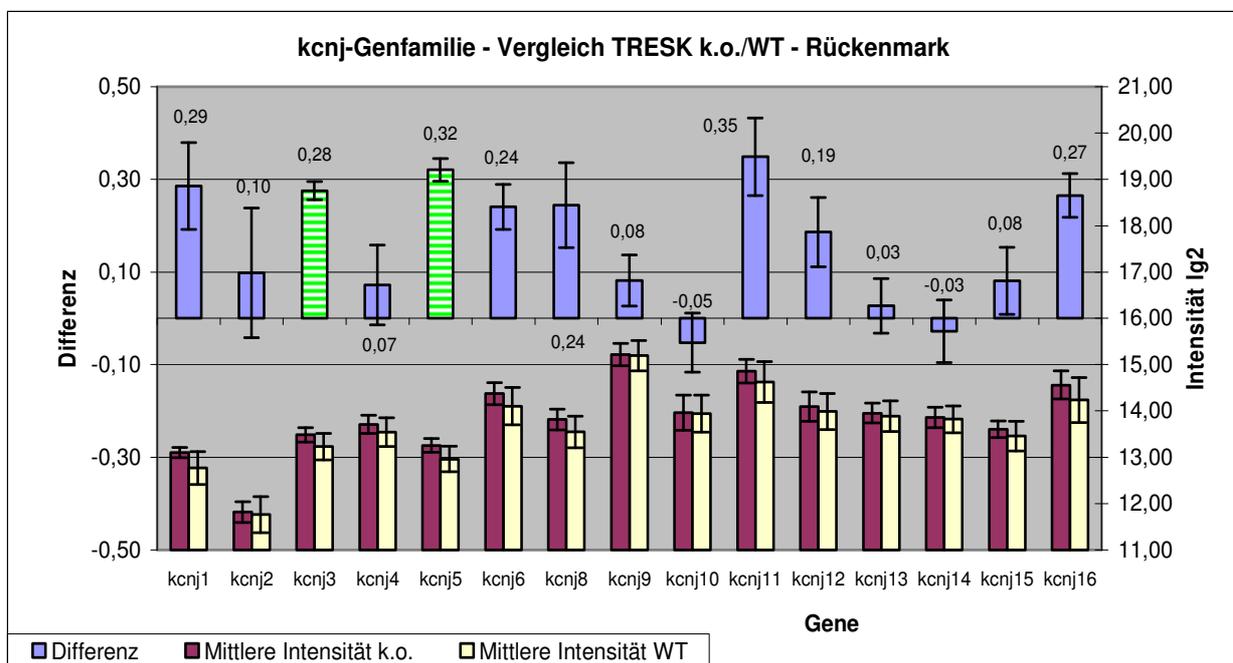


Abb. 4-40 Kompensation im Rückenmark

Darstellung der *kcnj*-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o. und passender WT kariert: Ab-Regulation, liniert: Hoch-Regulation.

Etwas anders zeigen sich die Mitglieder der *kcnk*-Genfamilie. Die einzige nennenswerte Regulation tritt bei *kcnk16* auf, dem gleichen Kandidaten, der auch im Gehirn für die Kompensation des Ausfalls des TRESK-Kanals verantwortlich zu sein scheint. Wie bei [0303] beschrieben, ist TALK1 ein Zweiporen-Domänenkaliumkanal, der bei Menschen vor allem im Rückenmark vorkommt, bei der Maus aber mit Hilfe der Microarray-Technologie von uns zusätzlich im Gehirn nachgewiesen wurde.

Die anderen Gene der *kcnk*-Genfamilie, die Differenzbeträge von über 0,2 aufweisen - *kcnk5* und *kcnk12* - sind aufgrund ihrer zum Teil hohen Standardabweichungen nur unter Vorbehalt als reguliert zu bezeichnen, wären aber sicherlich interessante Kandidaten für weitere Experimente.

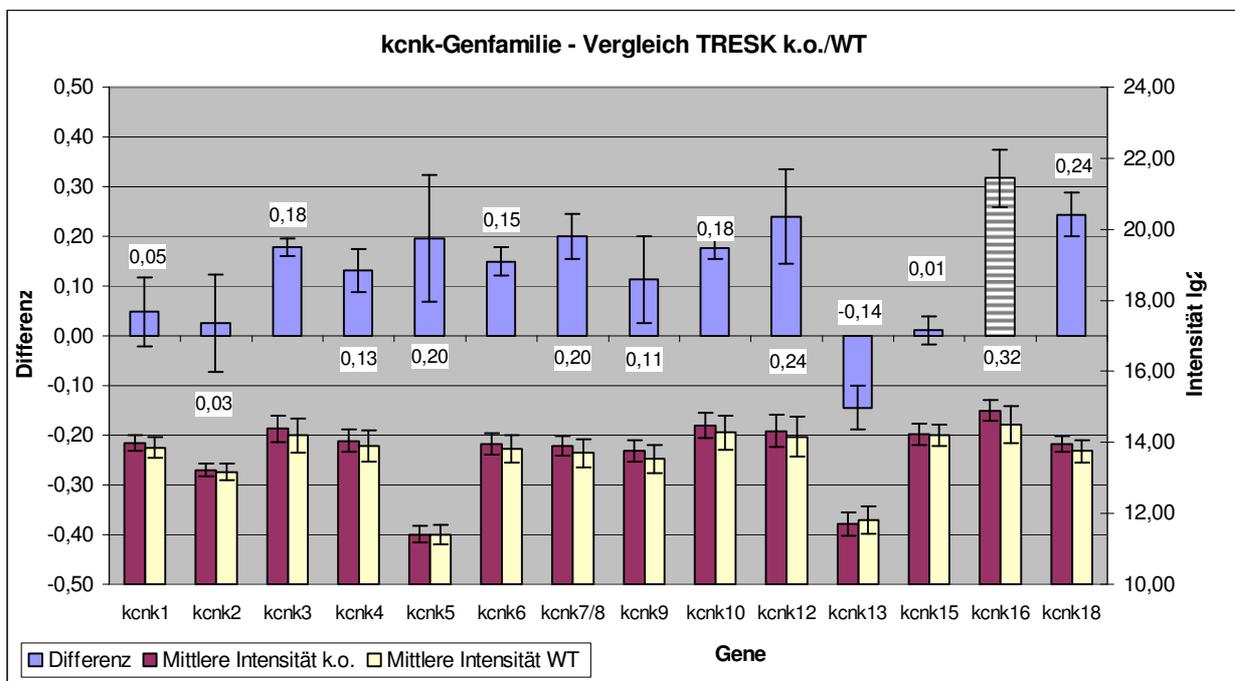


Abb. 4-41 Kompensation im Rückenmark

Darstellung der *kcnk*-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o. und passender WT - kariert: Ab-Regulation, liniert: Hoch-Regulation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch die Untersuchung von Rückenmarksgewebe hinsichtlich der Genexpression der Kaliumkanäle im Vergleich von TRESK-Knockout zu passendem Wildtyp zahlreiche Kandidaten liefert, die in weiteren Experimenten näher zu untersuchen wären. Das im Vergleich zum Gehirn verhältnismäßig höhere Maß an „regulierten“ Genen kann dabei zum einen auf den tatsächlichen Genexpressionsstatus zurückzuführen sein. Zum anderen hängen die Ergebnisse sicherlich in sehr hohem Maße von

der Präparation und dem Umfang des entnommenen Rückenmarksgewebes ab, so dass in diesem Falle höhere Abweichungen auftreten können.

4.2.3 Kompensation in den Spinalganglien

Zum Abschluss der Untersuchungen am TRESK-Knockout-Mausstamm im Vergleich zum passenden Wildtyp C3H wurde ein Versuch durchgeführt, der die Kompensationswege in den Spinalganglien analysiert.

In der Endauswertung spiegeln sich die Ergebnisse folgender Experimente wieder:

| Slide | Slide-Charge | Hybridisierungsdatum | Cy3 | Cy5 |
|-------|--------------|----------------------|------------|------------|
| 12 | 05/2006 | 21.06.2006 | 203 - WT | 230 - k.o. |
| 13 | 05/2006 | 21.06.2006 | 340 - k.o. | 203 - WT |
| 14 | 05/2006 | 22.06.2006 | 230 - k.o. | 315 - WT |
| 15 | 05/2006 | 22.06.2006 | 315 - WT | 340 - k.o. |

Anders als beim Rückenmark zeigten sich für die Spinalganglien deutlich andere Intensitäts- und Differenzspektren als beim Gehirn.

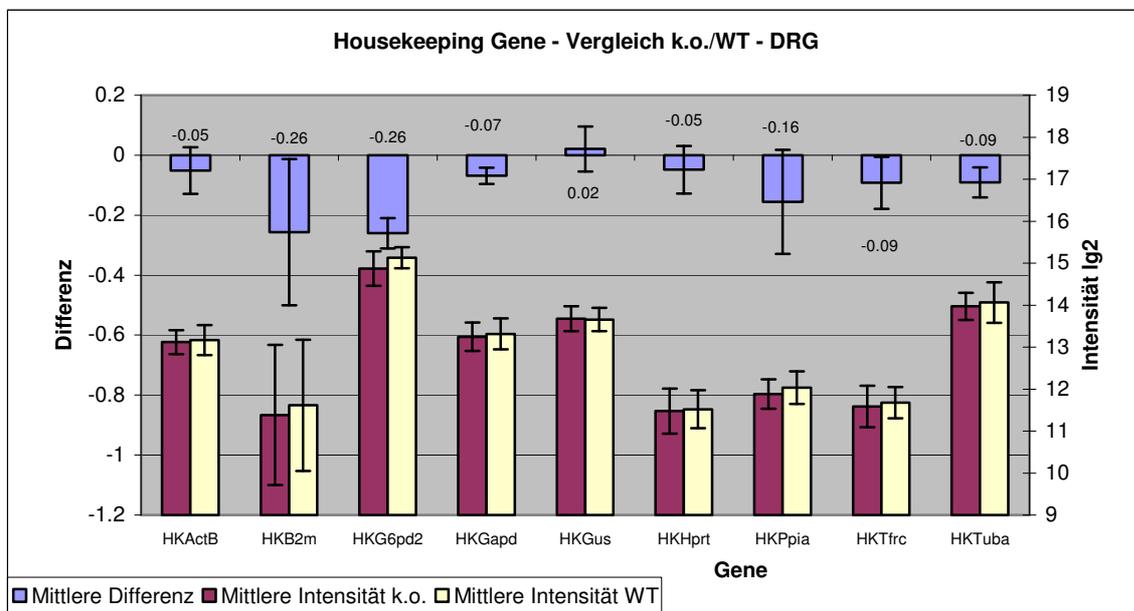


Abb. 4-42 Kompensation in den Spinalganglien

Darstellung der Housekeeping Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o.-Mäusen zu passendem Wildtyp

Wie aus Abb. 4-42 ersichtlich treten bei den Housekeeping Genen in den Ganglien kaum Regulationen auf. Lediglich G6pd2 weist mit -0,26 eine leichte negative Differenz auf und ist damit wie im Rückenmark (dort mit -0,64) als down-reguliert zu betrachten.

Die folgende Abbildung zeigt die regulierten Kaliumkanal-Gene dieses Versuches. Wie auf den ersten Blick zu erkennen, finden sich bei allen Kaliumkanälen inklusive der Zweiporendomänen- und einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle kaum Veränderungen in der Genexpression zwischen Knockoutstamm und Wildtyp.

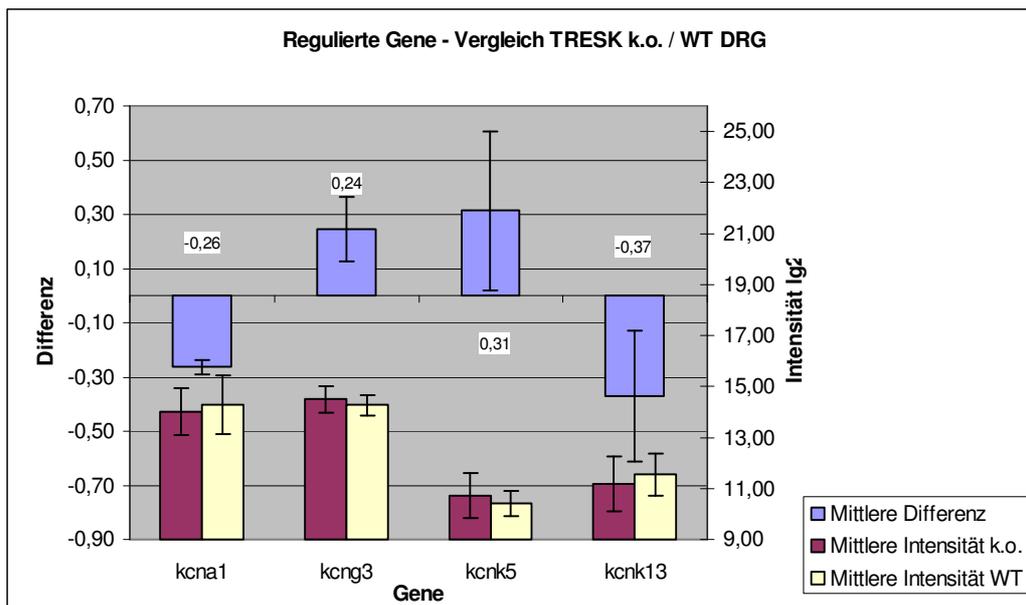


Abb. 4-43 Kompensation in den Spinalganglien

Darstellung der Regulierten Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o.-Mäusen zu passendem Wildtyp

Einzig kcna1 zeigt einen Differenzbetrag (-0,26) bei einer guten Standardabweichung knapp über der Filtergrenze von 0,2. Die drei anderen abgebildeten Gene kcng3, knck5 und knck13 haben zwar Differenzbeträge von ca. 0,3, sind aber aufgrund ihrer hohen Standardabweichungen unter Vorbehalt zu betrachten.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für die Genfamilien knkj und knck wie gewohnt nochmals im Einzelnen, wobei wie gerade beschrieben keine nennenswerten Regulationen zu beschreiben sind.

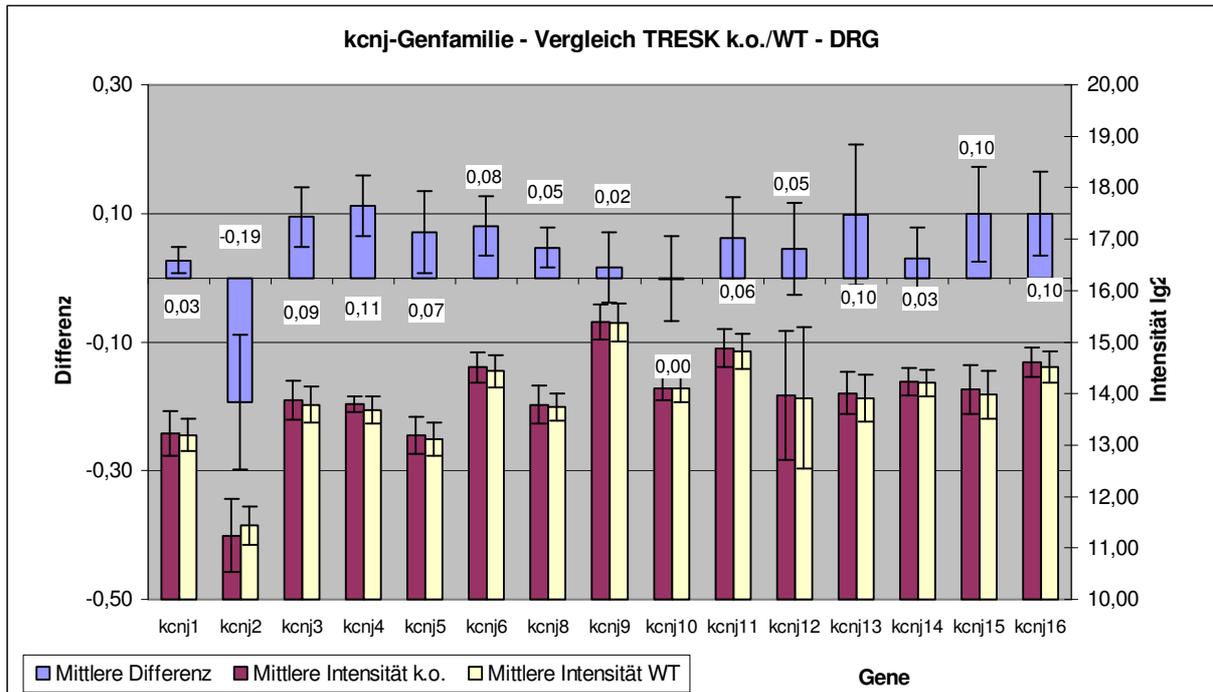


Abb. 4-44 Kompensation in den Spinalganglien

Darstellung der kcnj-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o. und passender WT

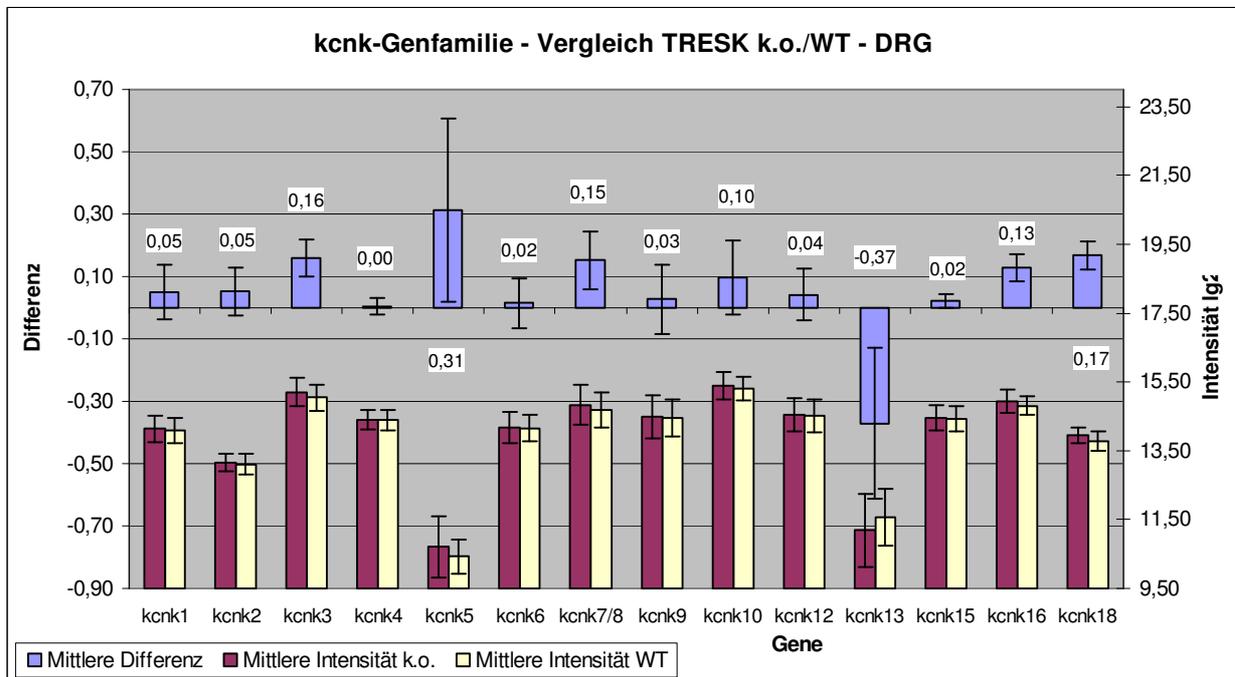


Abb. 4-45 Kompensation in den Spinalganglien

Darstellung der knk-Gene im Vergleich der Genexpression der beiden Gesamtdatensätze TRESK-k.o. und passender WT

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Gegensatz zum Rückenmark in den Spinalganglien kaum Kompensation zu beobachten ist. Auch der bei Gehirn und Rückenmark als direkter Kompensationskandidat beschriebene Kanal *kcnk16* (*TALK1*) weist keinen beachtenswerten Differenzbetrag auf.

Abschließend möchte ich auf Verlauf, die Inhalte und Ziele meiner Arbeit eingehen.

Das Ziel war die Erstellung eines Kaliumkanal-Microarrays für die Maus. Dieser sollte in der Lage sein, Unterschiede in der Genexpression bei Kaliumkanälen in verschiedenen Mausgeweben zu bestimmen und Hinweise auf Kompensationsmechanismen bei Knockout-Mäusen zu geben.

Ein zeitlicher großer Teil der Arbeit umfasste dabei die Datenbankrecherche zu den zum Zeitpunkt der Microarray-Erstellung bekannten Kaliumkanalgenen der Maus und die Gewinnung des entsprechenden DNA-Materials mittels PCR. Davon ausgehend konnte die Entwicklung des eigentlichen Microarrays beginnen und Testmessungen durchgeführt werden. Darunter waren Vergleiche verschiedener Mausstammlinien (CD1 und C57/Black6), ein umfangreicher Vergleich der Kaliumkanal-Genexpression in den Gesamtgehirnen von Mäusen verschiedener Altersstufen (Lebenstage 4, 9, 15, 20) sowie der Vergleich von bestimmten Mausgehirnarealen miteinander (Cortex, Kleinhirn, Gesamtgehirn). Beim Vergleich der Mausstammlinien ergaben sich geringfügige Unterschiede, die den Schluss nahelegten, dass bei der späteren Messung von Kompensationsmechanismen unbedingt der passende Wildtyp eingesetzt werden musste. Und nicht nur der Stamm musste passen, sondern auch das Alter, wie der Vergleich der unterschiedlichen Altersstufen zeigt.

Ausgehend von diesen vorbereitenden Messungen wurde die erste Knockout-Testreihe geplant und durchgeführt. Auch hier zeigten sich weitere „Kinderkrankheiten“, die in den folgenden Messreihen ausgebessert wurden. Zum Abschluss der Arbeit wurden Messungen durchgeführt, die hinreichende Hinweise auf mögliche Kompensationsvorgänge in den Knockoutmaus-Gehirnen lieferten. Das Ziel der Arbeit wurde also erreicht.

Bleibt die spannende Frage, wie es nun weitergehen könnte? Der cDNA-Microarray ist in der Lage mit relativ geringem Aufwand ein weitreichenden Überblick zu geben und so Kandidaten für weitere Untersuchungen wie Real-Time-PCR festzulegen, die dann genauere Zahlen zur Quantifizierung der Kompensation geben können.

Literaturverzeichnis

| Ziffer | Zitierte Literatur |
|--------|--|
| 8701 | Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. <i>Anal Biochem</i> 1987, 162(1): 156-159 |
| 9701 | Karschin, A., Wischmeyer, E., Döring, F., Karschin, C.: Kalium-Einwärtsgleichrichter – ursprüngliche Kanalstrukturen als Basis funktioneller Vielfalt. <i>Neuroforum</i> 4/97: 127-132 |
| 9702 | Karschin, C., Karschin, A.: Ontogeny of Gene Expression of Kir Channel Subunits in the Rat. <i>Molecular and Cellular Neuroscience</i> 1997, Vol.10: 131-148. |
| 9901 | Cheung, V.G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R., Childs, G.: Making and reading microarrays. <i>Nature genetics supplement</i> 1999, 21: 15-19. |
| 9902 | Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M.: Expression profiling using cDNA microarrays. <i>Nature genetics supplement</i> 1999, 21: 10-14. |
| 9903 | Souther, E., Mir, K., Shchepinov, M.: Molecular interactions on microarrays. <i>Nature genetics supplement</i> 1999, 21: 5-9. |
| 0001 | Miller, C.: An overview of the potassium channel family. <i>Genome Biology</i> 2000, 1: reviews0004.1-0004.5. |
| 0002 | Kane, M.D., Jatkoa, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D., Madore, S.J.: Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. <i>Nucleic Acids Research</i> 2000, Vol.28 No.22: 4552-4557. |
| 0003 | Lockhart, D.J., Winzeler, E.A.: Genomics, gene expression and DNA arrays. <i>Nature</i> 2000, Vol.405: 827-836. |
| 0004 | Kerr, M.K., Martin, M., Churchill, G.A.: Analysis of Variance for Gene Expression Microarray Data. <i>Review</i> , 2000. |
| 0101 | Karschin, A.: K⁺ Kanäle mit zwei Porendomänen: funktionelle Bedeutung einer neuen Proteinfamilie im Nervensystem. <i>Neuroforum</i> 3/01: 82-92. |

| | |
|------|--|
| 0102 | Patel, A.J., Honoré, E.: Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. <i>TRENDS in Neurosciences</i> 2001, Vol.24 No.6: 339-346. |
| 0103 | Kerr, M.K, Churchill, G.A.: Experimental design for gene expression microarrays. <i>Biostatistics</i> 2001, Vol.2: 183-201. |
| 0104 | Hill, A.A., Brown, E.L., Whitley, M.Z., Tucker-Kellog, G., Hunter, C.P., Slonim, D.K.: Evaluation of normalization procedures for oligonucleotide array data based on spiked cRNA controls. <i>Genome Biology</i> 2001, Vol.2(12): research0055.1-0055.3. |
| 0105 | Kerr, M.K., Churchill, G.A.: Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. <i>Genet. Res.</i> 2001, Vol.77: 123-128. |
| 0106 | Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M., Hoheisel, J.D.: Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. <i>Nucleic Acids Research</i> 2001, Vol.29 No.7. |
| 0107 | Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kelsell, R.E., Gloger, I.I., Pangalos, M.N.: Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system und periphery. <i>Molecular Brain Research</i> 2001, Vol.86: 101-114. |
| 0108 | Talley, E.M., Solorzano, G., Qiubo, L., Kim, D., Bayliss, D.A.: CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (kcnk) Potassium Channel Family. <i>The Journal of Neuroscience</i> 2001, Vol.21(19): 7491-7505. |
| 0201 | Churchill, G.A.: Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. <i>Nature genetics supplement</i> 2002, Vol.32: 490-495. |
| 0202 | Yang, H.Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., Speed, T.P.: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. <i>Nucleic Acids Research</i> 2002, Vol. 30, No. 4, 1-10. |
| 0203 | Quackenbush, J.: Microarray data normalization and transformation. <i>Nature genetics supplement</i> 2002, Vol. 32: 496-501. |
| 0204 | Diehl, F., Beckmann, B., Kellner, N., Hauser N.C., Diehl, S., Hoheisel, J.D.: Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. <i>Nucleic Acids Research</i> 2002, Vol. 30, No. 16. |
| 0301 | Benes, V., Muckenthaler, M.: Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. <i>TRENDS in Biochemical Sciences</i> 2003, Vol.25 No.5: 244-249. |

| | |
|------|--|
| 0302 | Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., Furuichi, K.: A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. <i>J. Biol. Chem.</i> 2003. |
| 0303 | Han, J., Kang, D., Kim, D.: Functional properties of four splice variants of a human pancreatic tandem-pore K⁺ channel, TALK-1. <i>Am J Physiol Cell Physiol</i> 2003. |
| 0401 | Pountney, D.J.: Neuronal Potassium Channels. GP0396 Molecular and Cellular Neuroscience 2004. |
| 0402 | Berger, J.A., Hautaniemi, S., Järvinen, A.-K., Edgren, H., Mitra, S.K., Astola, J.: Optimized LOWESS normalization parameter selection for DNA microarray data. <i>BMC Bioinformatics</i> 2004, 5 : 194. |
| 0501 | Zhang, X., Ding, L., Sandford, A.J.: Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. <i>BMC Molecular Biology</i> 2005, Vol.6 No.4. |
| 0502 | Nomenclature and Molecular Relationships of Potassium Channels: Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wulff, H.: Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. <i>Pharmacol. Rev.</i> 2005, Vol.57: 463-472. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., Wang, X.: Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. <i>Pharmacol. Rev.</i> 2005, Vol.57: 473-508. Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., Vandenberg, C.A.: Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. <i>Pharmacol. Rev.</i> 2005, Vol.57: 509-526. Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Donghee, K., Lesage, F., Plant, L.D., Rajan, S.: Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. <i>Pharmacol. Rev.</i> 2005, Vol.57: 527-540. |
| 0601 | Mei, H., Tarczy-Hornoch, P., Mork, P., Rossini, A.J., Shaker, L., Donelson, L.: Expression Array Annotation using the BioMediator Biological Data Integration System and the BioConductor Analytic Platform. http://www.bioconductor.org/ |

| | |
|------|---|
| 0701 | http://images.google.de/imgres?imgurl=http://www.nature.com/nrn/journal/v3/n2/images/nrn727f1.gif&imgrefurl=http://www.nature.com/nrn/journal/v3/n2/fig_tab/nrn727_F1.html&usg=__SxPpDudqJkNsvXewaC5Y9iAU1DM=&h=446&w=600&sz=30&hl=de&start=4&um=1&tbnid=9VobgNEIFmYomM:&tbnh=100&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dpotassium%2Bchannel%26hl%3Dde%26um%3D1 |
|------|---|

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|--------|------------------------------------|--|--|
| kcna1 | Kv1.1, assoz. mit Kvβ1, Kvβ2 | Gehirn, Herz, Retina, Skelettmuskel | Erhaltung des Membranpotentials, Modulation der elektr. Erregbarkeit in Neuronen und Muskeln |
| kcna2 | Kv1.2, assoz. mit Kvβ1, Kvβ2 | Gehirn (v.a. Brücke, Medulla, Cerebellum, dann Hippocampus, Thalamus, auch Mittelhirn, Geruchszentrum), Rückenmark... | s.o. |
| kcna3 | Kv1.3, assoz. mit Kvβ | Gehirn (inferior colliculus > Geruchszentrum, Brücke/Medulla > Mittelhirn, Hippocampus), Lunge, Langerhans'sche Inseln, Thymus, Milz, T/B- Lymphozyten.... | Regulation des Membranpotentials und der Ca-Signalübertragung in Lymphozyten und Oligodendrozyten |
| kcna4 | Kv1.4, assoz. mit Kvβ | Gehirn (Geruchszentrum, corpus striatum > Hippocampus, superior/inferior colliculus > cerebral cortex > pons), Skelettmuskel, Herz, Pankreas | neuronale „after- Hypolarisation“ |
| kcna5 | kv1.5, assoz. mit Kvβ1, Kvβ2 | Aorta, Kolon, Niere, Magen, glatte Muskulatur, kompletter Embryo, Oligodendrozyten | Eigenschaften ähnlich dem ultra-schnell aktivierenden $I_{k_{ur}}$ -Strom im Herzen, aber durch „antisense targeting“ auch Unterdrückung der $I_{k_{ur}}$ - Ströme um 50% durch Kv1.5 möglich |
| kcna6 | Kv1.6, assoz. mit Kvβ1, Kvβ2 | Gehirn, Kolon, Keimzelle, Herz, Lunge, Ovarien, Testis, Astrozyten, glatte Muskelzellen der pulmonalen Arterien, Oligodendrozyten | Regulation von Membranpotentialen in Neuronen |
| kcna7 | Kv1.7 | Plazenta, Amnion, Langerhans'sche Inseln, Skelettmuskel, Herz, Pulmonalarterien | Eigenschaften ähnlich dem ultra-schnell aktivierenden $I_{k_{ur}}$ -Strom im Herzen |
| kcna10 | Kv1.8 assoz. mit kcna4b | Niere (Rinde > Mark), Gehirn, Herz, Skelettmuskel, | Regulation der Membranpotentials im proximalen Tubulus der Niere |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|---|---|--|
| kcnb1 | Kv2.1 assoz. mit Kv5.1, Kv6.1-6.3, Kv8.1, Kv9.1-9.3 | Gehirn (cerebral cortex > Hippocampus > cerebellum), Vorhöfe, Herzkammern, Skelettmuskel, Retina, Cochlea, Auge, Keimzelle | Erhaltung des Membranpotentials, Modulation der elektr. Erregbarkeit in Neuronen und Muskeln |
| kcnb2 | Kv2.2, assoz. mit Kvβ4 (verstärkt die Kv2.2-Expression), Kv8.1, Kv9 | Gehirn (Geruchszentrum > Cortex > Hippocampus > Cerebellum), Herzkammern, Zunge, sympathische Neuronen, glatte Muskulatur des GI-Traktes | Erhaltung des Membranpotentials, Modulation der elektr. Erregbarkeit in Neuronen |
| kcnc1 | Kv3.1 | Gehirn (Cerebellum > Subthalamus, Substantia nigra > reticular thalamic nuclei, cortical und hippocampal interneurons > inferior colliculi, cochlear and vestibular nuclei), Skelettmuskulatur, Keimzelle, Lunge, Testis | entscheidend für „high-firing“ Frequenz des Gehörs und „fast spiking“ GABAerge Interneuronen |
| kcnc2 | Kv3.2 | Gehirn (fast-spiking GABAergic interneurons des Neocortex, Hippocampus), Langerhans'sche Zellen | ? |
| kcnc3 | Kv3.3 | Gehirn (Elektrosensorik, Cerebellum, central auditory nuclei), mesenteric artery, Linse und corneal epithelium | ? |
| kcnc4 | Kv3.4 assoz. mit MIRP2 (=kcne3) im Skelettmuskel | Nebenschilddrüse, Prostata, Gehirn (Hirnstamm, Hippocampus), Skelettmuskel, azinöse Pankreaszellen | ? |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|--|---|--|
| kcnd1 | Kv4.1, KCHIP1 „aktiviert“ Kv4.1 | Gehirn (Fötus bis adult), Kolon, Lunge Magen, Testis, Leber, Niere, Schilddrüse, Pankreas, Pulmonalarterie | ? |
| kcnd2 | Kv4.2, aktiviert durch KCHIP1, interagiert mit KCHIP4/CALP, interag. mit Kv4.3 | Gehirn (Cerebellum > Hippocampus, Thalamus > cerebral cortex, Vorderhirn, konzentriert in Dendriten und Soma), Innenohr-Kern, Vorhöfe, Herzkammern | Repolarisation beim Aktionspotential im Herzen, verantwortlich für den I _{to} - Strom im Herzen (zusammen mit Kv4.3) |
| kcnd3 | Kv4.3, aktiviert durch KCHIP1 o. durch Kvβ2, interagiert mit KCHIP4, interag. mit Kv4.2 | Herz, Gehirn, glatte Muskulatur | Repolarisation beim Aktionspotential im Herzen, verantwortlich für den I _{to} - Strom im Herzen (zusammen mit Kv4.2) |
| kcnf1 | Kv5.1, Kv2.1/2.2 | Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Pankreas, Herz- Myozyten | beeinflusst die Eigenschaften (hinsichtlich Takt und Öffnungszeit) der Kv2.1 und Kv2.2-Kanäle (down- Regulation) |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|---|--|---|
| kcng1 | Kv6.1 (modifier/silencer), assoz. mit Kv2- Kanälen | Skelettmuskulatur, Gehirn, Uterus, Ovarien, Niere, Pankreas, Plazenta, Knochen, Keimzelle, Prostata, Haut, Testis, Herz- Myozyten | bei alleiniger Expression nicht fähig einen Stromfluß hervorzurufen! Unterdrückt Kv2.1- Ströme (nicht so effektiv wie Kv5.1), verlängert die Zeit der Aktivierungs- phase und verlangsamt die Inaktivierung; leichte Unterdrückung von Kv2.2 |
| kcng2 | Kv6.2 (modifier/silencer), assoz. mit Kv2- Kanälen am N- Terminus | Myokard, Fötus-Gehirn | bei alleiniger Expression nicht fähig einen Stromfluß hervorzurufen! kombiniert mit den Kv2- Kanälen entstehen durch die modifizierenden / abschwächenden Eigenschaften von Kv6.2 Kanäle mit einzigartigen Eigenschaften |
| kcng3 | Kv6.3 (Kv10.1) (modifier/silencer), assoz. mit Kv2.1 | gesamtes Gehirn, Rückenmark, Hypophyse, Testis, Dünndarm, Thymus, Nebenniere | bei alleiniger Expression nicht fähig einen Stromfluß hervorzurufen! kombiniert mit den Kv2.1-Kanälen entstehen durch die modifizierenden / abschwächenden Eigenschaften von Kv6.3 Kanäle mit einzigartigen Eigenschaften |
| kcng4 | Kv6.4 | Gehirn (Sustantia nigra, Cerebellum), Skelettmuskulatur, Rückenmark, Testis, Milz | keine Angaben gefunden |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|--|--|--|
| kcnh1 | Kv10.1 (spannungsabhängiger Kaliumkanal, für verzögerte Gleichrichtung), assoz. mit KCR1 | Gehirn (überall, bis auf: Subst. nigra, Thalamus, Medulla oblongata), Myoblasten, Skelettmuskulatur, Melanom-Zellen, verlagerte/untypische Expression in Krebszelllinien und Tumorzellen in verschiedenen Geweben | spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellcyclus und/oder Zell-Proliferation |
| kcnh2 | Kv11.1 (spannungsabhängiger Kalium-Kanal mit einwärtsgleichrichtenden Eigenschaften), assoz. mit MinK, möglicherweise mit MiRP1 (kcne2), Heteromerbildung mit Kv11.2, Kv11.3 | Leiomyosarcom, Hippocampus, Neuroblastom; Blutzellen, Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Ovarien, Pankreas, Testis, Prostata, Dünndarm, Rachen, Uterus | Im Herzen: kleine Auswärts-Ströme, die das Erholungspotential regulieren und zur Endphase der Repolarisation beitragen; haben zum einen Eigenschaften wie andere auswärtsgleichrichtende Kaliumkanäle, zum anderen aber auch einen Inaktivierungs-Mechanismus, der den Ausfluss während der Depolarisation abschwächt. |
| kcnh3 | Kv12.2 (spannungsabhängiger Kaliumkanal) | kindliches Gehirn, Lunge, Auge, Hüftnerve, Hirnrinde, Mandeln, Hippocampus | ? (nicht bekannt) |
| kcnh4 | Kv12.3 (langsam aktivierender, spannungsabhängiger Kaliumkanal) | Gehirn, Neuroblastom, Ösophagus, Oligodendroglioma, Lunge, Cerebellum, Schilddrüse | ? (nicht bekannt) |
| kcnh5 | Kv10.2 (auswärtsgleichrichtende, nicht aktivierende spannungsabhängige Kalium-Ströme), assoz. mit KCR1 | Gehirn (4.Lage des cerebralen Cortex, Thalamus, inferior colliculus, Geruchszentrum) | ? (nicht bekannt) |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|---|--|-------------------|
| kcnh6 | Kv11.2 (spannungsabhängiger Kaliumkanal), Heteromerbildung mit Kv11.1, Kv11.3 | Gehirn, Uterus, Leiomyosarcom, Hippocampus, Neuroblastom, Lactotrophe Zellen | ? (nicht bekannt) |
| kcnh7 | Kv11.3 (spannungsabhängiger Kaliumkanal), Heteromerbildung mit Kv11.1, Kv11.2 | Gehirn, Ganglien des Sympathicus, lactotrophe Zellen | ? (nicht bekannt) |
| kcnh8 | Kv12.1 (langsam aktivierender, und langsam deaktivierender spannungsabhängiger Kaliumkanal) | Ganglien des Sympathicus, Testis, Gehirn, Kolon, Lunge, Uterus | ? |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|------------------------------|---|---|---|
| kcnj1, ROMK1 | Kir1.1 (Untereinheit des einwärtsgerichteten Kanals Kir1.1) | Nierenrinde, äußere Medulla, Milz | ?, 6 Splice-Varianten (a-f) |
| kcnj2, IRK1 | Kir2.1 (Kir2.1-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle) | Vorderhirn, Herz, Skelettmuskulatur, Endothelzellen der Aorta, Makrophagen | Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und Repolarisation beim AP im Herzen, I_{K1} -Strom im Herzen mit anderen Kir2-Untereinheiten |
| kcnj3 GIRK1 | Kir3.1 (Untereinheit des G-Protein-gekoppelten, einwärtsgerichteten Kaliumkanals) | Vorderhirn, Cerebellum, Vorhöfe | Rezeptor-abhängige Hyperpolarisation des Membranpotentials |
| kcnj4 IRK3 | Kir2.3 (Kir2.3-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle) | Vorderhirn, Herz | Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und Repolarisation beim AP im Herzen, I_{K1} -Strom im Herzen mit anderen Kir2-Untereinheiten |
| kcnj5 GIRK4 | Kir3.4 (Untereinheit des G-Protein-gekoppelten, einwärtsgerichteten Kaliumkanals), assoz. mit Kir 3.1, 3.2, 3.3, 3.5 | Herzarterien und andere „Schrittmacher“-Herzgewebe, stark beschränkte Gebiete im Gehirn: Calleja-Inseln, Cerebellum, Cortex, Pyramidalzellen im Hippocampus | Vermittelt die Vagus-induzierte Reduktion der Herzfrequenz durch muskarinische ACh M_2 - und $G_{\alpha i}$ -gekoppelte Adenosin- und Somatostatin-Rezeptoren, im Gehirn möglicherweise aktiviert durch musk. ACh, $GABA_B$, D_2 , $5-HT_{1A}$, Adenosin, Somatostatin, Enkephalin-Rezeptoren und β_2 -Adrenozeptoren |
| kcnj6 GIRK2 | Kir3.2 (Untereinheit des G-Protein-gekoppelten, einwärtsgerichteten Kaliumkanals), assoz. mit Kir 3.1, 3.3, 3.4, Kir 3.2d (homomultimer im Sperma) | Kir3.2b: universell exprimiert, Kir3.2d: Spermazellen in der Testis | Rezeptor-abhängige Hyperpolarisation des Membranpotentials, Kir3.2d möglicherweise beteiligt an der Spermatogenese |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|----------------|---|---|---|
| kcnj8 | Kir6.1 (UE des ATP-sensitiven Kaliumkanals, NDP-abhängig), assoz. mit SUR1, SUR2A/B, | universell exprimiert, v.a. in der vaskulären, glatten Muskulatur | Regulation des Tonus der glatten vaskulären Muskulatur |
| kcnj9 GIRK3 | Kir3.3 (Untereinheit des G-Protein-gekoppelten, einwärtsgerichteten Kaliumkanals), assoz. mit Kir3.1, 3.2 | Gehirn | Rezeptor-abhängige Hyperpolarisation des Membranpotentials |
| kcnj10 | Kir4.1 (Einwärts-Gleichrichter), assoz. mit Kir5.1 | Gliazellen (Astrozyten im Gehirn, Müller-Zellen in der Retina), basolaterale Membran der Epithelzellen im distalen Tubulus und der Randzellen der Stria vascularis im Innenohr, Satelliten-Zellen der Innenohr-Ganglien | K ⁺ -Transport (K ⁺ -Puffer in Gliazellen, K ⁺ -Recycling im Epithelium) |
| kcnj11 | Kir6.2 (UE des ATP-sensitiven Kaliumkanals), assoz. mit SUR1, SUR1A/B | β-Zellen der Pankreas, Herz, Skelettmuskulatur, Gehirn | Regulation der Insulinsekretion in den Pankreas-β-Zellen, Sauerstoff und Glucose-Sensor im Gehirn, Zellprotektion während Ischämien in Herz oder Gehirn |
| kcnj12 IRK | Kir2.2 (Kir2.2-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle) | Kleinhirn, Skelettmuskulatur, Niere Herz, Vorderhin | Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und Repolarisation beim AP im Herzen, I _{K1} -Strom im Herzen mit anderen Kir2-Untereinheiten |
| kcnj13 | Kir7.1 (Einwärts-Gleichrichter) | Purkinje-Zellen im Kleinhirn, Pyramidal-Zellen des Hippokampus, Aderhaut-Geflecht, Niere, Dünndarm, Prostata, Testis, Lunge | Beitrag zum Ruhe-Membranpotential in Neuronen und Epithelzellen, transepithelialer Kaliumtransport |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-----------------|--|---|---|
| kcnj14 | Kir2.4 (Kir2.4-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle) | Herz, Gehirn, Retina | Einstellung des Membranpotentials nahe E_K I_{K1} -Strom im Herzen mit anderen Kir2-Untereinheiten |
| kcnj15 ROMK3 | Kir4.2 (Kir4.2-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle) | nicht bekannt | nicht bekannt |
| kcnj16 | Kir5.1 (Kir5.1-Untereinheit für einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle), assoz. mit Kir4.1 | Niere, Milz, Adrenaldrüse. Leber, Gehirn, Testis | nicht bekannt |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-----------------|--|---|--|
| kcnk1 TWIK1 | K2P1.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal) | Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Plazenta | nicht bekannt |
| kcnk2 TREK1 | K2P2.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter oder spannungsabhängig) | Gehirn, Herz | nicht bekannt |
| kcnk3 TASK1 | K2P3.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Dünndarm, Kolon, Pankreas, Prostata, Uterus, Plazenta | nicht bekannt |
| kcnk4 TRAAK | K2P4.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Gehirn, Niere, Dünndarm, Plazenta, Prostata | nicht bekannt |
| kcnk5 TASK2 | K2P5.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Gehirn, Niere, Leber, Dünndarm, Pankreas, Plazenta | nicht bekannt |
| kcnk6 TWIK2 | K2P6.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Pankreas, Plazenta, Herz (gilt für Mensch, bei der Ratte auch: Gehirn, Lunge, Niere, Leber, Milz, Herz, Ösophagus, Magen, Kolon, Skelettmuskulatur) | nicht bekannt |
| kcnk8 | K2P7.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal) Achtung: heißt beim Menschen: kcnk7 | Retina (beim Mensch auch im Gehirn) | nicht bekannt, für kcnk8 noch kein funktionierender Kanal gezeigt! |
| kcnk9 TASK3 | K2P9.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Gehirn (bei der Ratte auch bekannt: Niere, Leber, Lunge, Kolon, Magen, Milz, Testis, Skelettmuskel) | nicht bekannt |
| kcnk10 TREK2 | K2P10.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offengleichrichter) | Niere, Pankreas, Prostata, Thymus, Leber, Herz | nicht bekannt |
| kcnk12 THIK2 | K2P12.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal) | Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Dünndarm, Kolon, Pankreas, Prostata, Plazenta, Milz, Thymus, Ovarien | nicht bekannt |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|--------------------------|--|---|---|
| kcnk13 THIK1 | K2P13.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offen-Gleichrichter) | Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Milz | nicht bekannt |
| kcnk15 TASK5 | K2P15.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal) | Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Adrenaldrüse, Schilddrüse, Speicheldrüse, Plazenta | nicht bekannt, bis jetzt kein funktioneller Kana bekannt |
| kcnk16 TALK1 | K2P16.1 (Zwei-Poren-Domänen-Kalium-Kanal, offen-Gleichrichter) | Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Plazenta | nicht bekannt |
| kcnk17 TALK2 TASK4 | K2P17.1 | gibt es bei Maus und Ratte wohl nicht, da an der fraglichen Stelle ein Chromosomenbruch ist, der das vermeintliche k17-Gen auf Chr. 14 und 17 aufteilt! | s. Gewebe |
| kcnk18 TRESK | K2P18.1 | ? | ? |
| kcnma1 Slo | KCa1.1 Calcium- und spannungsaktivierter Kaliumkanal mit beträchtlicher Leitfähigkeit assoz. mit Slack? | universell exprimiert, v.a. Gehirn, Skelttmuskel, glatte Muskulatur, Innenohr-Haarzellen, Odontoblasten, Pankreas-Inselzellen, Kolon- und Nieren-Epithelium | pleiotrop, Selektivität gekoppelt mit N-Typ, spannungsaktivierten Ca-Kanälen, zur Vermittlung von: schnelle Nach-Hybridisierung in Neuronen, elektr. Tuning von „non-spiking“ Eigenschaften in den Haarzellen des Innenohrs, präsynaptische Regulation der Neurotransmitter – Freisetzung |
| kcnma3 Slo3 | KCa5.1 Spannungs-abhängiger Kaliumkanal | Spermatozyten, Testis | ? |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|---|---|---|
| kcnn1 | KCa2.1 Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit; aktiviert über einen Calmodulin-abhängigen Mechanismus, assoz. mit Calmodulin am C-Terminus | Gehirn (Amygdala > Hippocampus, caudate nucleus, Fötus-Gehirn > Kleinhirn > Thalamus, Substantia nigra, Rückenmark; Hirnanhangdrüse) | beteiligt an der Nach-Hyperpolarisation in Wirbeltier-Neuronen, Der Kanal ist spannungsabhängig und schwach gleichrichtend. Konservierte Intron-Exon-Struktur von KCa2.1-2.3 und KCa3.1 |
| kcnn2 | KCa2.2 Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit; aktiviert über einen Calmodulin-abhängigen Mechanismus, assoz. mit Calmodulin am C-Terminus | Gehirn (Rückenmark > Hippocampus, Kleinhirn > Amygdala > Fötus-Gehirn > Hirnbalken, Thalamus, caudate nucleus, Substantia nigra), Hirnanhangsdrüse, Melanocyten, Melanome, Keimzell-Tumore, Prostata, Lunge, Leber, Herz, Skelettmuskulatur | beteiligt an der Nach-Hyperpolarisation in Wirbeltier-Neuronen, Der Kanal ist spannungsabhängig und schwach gleichrichtend. Konservierte Intron-Exon-Struktur von KCa2.1-2.3 und KCa3.1 |
| kcnn3 | KCa2.3 Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit; aktiviert über einen Calmodulin-abhängigen Mechanismus, assoz. mit Calmodulin am C-Terminus | Gehirn (Subst. nigra > Amygdala, caudate nucleus, Thalamus, Hippocampus, Kleinhirn, Rückenmark > Hirnbalken, Fötus-Gehirn), Lymphozyten, Skelettmuskulatur, Myometrium, Prostata, Niere, Herz, Hirnanhangsdrüse, Leber, Pankreas, Kolon | beteiligt an der Nach-Hyperpolarisation in Wirbeltier-Neuronen, Der Kanal ist spannungsabhängig und schwach gleichrichtend. Konservierte Intron-Exon-Struktur von KCa2.1-2.3 und KCa3.1 |
| kcnn4 | KCa3.1 Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit; aktiviert über einen Calmodulin-abhängigen Mechanismus, assoz. mit Calmodulin am C-Terminus | Plazenta, Prostata, Erythrozyten, Lymphozyten, Leber, Fötus-Leber, Pankreas, | beteiligt an der Volumen-Regulation in den Erythrozyten, die Expression ist hoch-reguliert während der Aktivierung der Lymphozyten |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|--|--|---|
| kcnq1 | Kv7.1 (spannungsabhängiger Kaliumkanal, „verzögerter“ Gleichrichter), assoz. mit kcne1,3 | Herz, Niere, Rektum, Ohr, Keim, Pankreas, Lunge, Innenohr, Plazenta | Repolarisation des Aktionspotential im Herzen (kcnq1 und kcne1 bilden zusammen die IK_S -Kanal im Herzen), Kalium-Recycling an der basolateralen Membran der intestinalen „crypt“-Zellen und im Innenohr |
| kcnq2 | Kv7.2 (spannungsabhängiger Kaliumkanal, „verzögerter“ Gleichrichter), assoz. mit kcne2, kcnq3(nicht zwingend!) | kindliches Gehirn, erwachsenen Gehirn, Fötus-Gehirn, sympathische Ganglien, Lunge, Testis, Fötus-Herz, erwachsenes Herz, Brust, Auge, Keimzellen, Plazenta, Dünndarm, Neuroblastom | bestimmt die „unterschwellige“ Erregbarkeit von Neuronen; kcnq2,3 erzeugen gemeinsam den M-Strom im Gehirn (M-Strom, langsamer K-Kanal, der im Ruhezustand (unterschwellig!) die Erregbarkeit und die Empfindlichkeit auf synaptische Eingänge beeinflusst) |
| kcnq3 | Kv7.3 spannungsabhängiger Kaliumkanal, „verzögerter“ Gleichrichter), assoz. mit kcnq2,5 | Gehirn, Testis, Retina, Kolon, Auge, Kopf, Genick | bestimmt die „unterschwellige“ Erregbarkeit von Neuronen; kcnq2,3 erzeugen gemeinsam den M-Strom im Gehirn (M-Strom, langsamer K-Kanal, der im Ruhezustand (unterschwellig!) die Erregbarkeit und die Empfindlichkeit auf synaptische Eingänge beeinflusst) |
| kcnq4 | Kv7.4 (spannungsabhängiger Kaliumkanal, „verzögerter“ Gleichrichter), assoz. mit kcnq3 | Innenohrschnecke (äußere Haarzellen), Plazenta, Vestibular-Organ, auditiver Nucleus im Hirnstamm | vermittelt den Kalium-Ausstrom aus den äußeren Haarzellen |
| kcnq5 | Kv7.5 (spannungsabhängiger Kaliumkanal, „verzögerter“ Gleichrichter), assoz. mit kcnq3 | Gehirn, sympathische Ganglien (Splice-Variante I), Skelettmuskulatur (Splice-Variante II) | bestimmt die „unterschwellige“ Erregbarkeit von Neuronen |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|------------------------|--|---|---|
| kcns1 | Kv9.1 Modifier / silencer kooperiert mit Kv2- Familien-Kanälen | Kindliches und erwachsenes Gehirn, im Mausgehirn ist die Verteilung ähnlich der Verteilung von Kv9.2, mit der stärksten Expression im Geruchszentrum, Großhirnrinde, Hippocampus, Habenula, basolaterale amygdale Nuclei, Kleinhirn; Kv9.1 und Kv9.2 sind ko- lokalisiert mit Kv2.1- und/oder Kv2.2- α -UE in einigen Regionen | nicht alleine funktionell! Regulation der Membranpotential- und Aktionspotential- Frequenz durch Modulation des Stromflusses durch die verzögerten Gleichrichter, moduliert die Aktivität der Kv2.1 und Kv2.2 α -UE durch Änderung der Kinetik und Expressionshöhe und durch Verschiebung des Halb- Inaktivierungs-Potentials zu höher polarisierten Werten; Kv9.1 verstärkt die Einzel- Kanal-Leitfähigkeit von Kv2.1 |
| kcns2 | Kv9.2 Modifier / silencer kooperiert mit Kv2- Familien-Kanälen | kindliches, adultes Gehirn, Retina, Rückenmark, , im Mausgehirn ist die Verteilung ähnlich der Verteilung von Kv9.1, mit der stärksten Expression im Geruchszentrum, Großhirnrinde, Hippocampus, Habenula, basolaterale amygdale Nuclei, Kleinhirn; Kv9.1 und Kv9.2 sind ko- lokalisiert mit Kv2.1- und/oder Kv2.2- α -UE in einigen Regionen | nicht alleine funktionell! Regulation der Membranpotential- und Aktionspotential- Frequenz durch Modulation des Stromflusses durch die verzögerten Gleichrichter, moduliert die Aktivität der Kv2.1 und Kv2.2 α -UE durch Änderung der Kinetik und Expressionshöhe und durch Verschiebung des Halb- Inaktivierungs-Potentials zu höher polarisierten Werten; Kv9.1 verstärkt die Einzel- Kanal-Leitfähigkeit von Kv2.1 |
| kcns3 | Kv9.3 Modifier / silencer kooperiert mit Kv2- Familien-Kanälen | Gehirn, Brust, Kolon, Auge, Linse, Herz, Niere, Muskel, Lunge, Testis, Haut, Magen, Uterus | nicht alleine funktionell! Regulation des Membranpotentials (in Pulmonararterien-Myozyten) |
| kcnt1 Slo2 Slack | KCa4.1 | Gehirn, Testis, Niere | nicht bekannt |
| kcnt2 | KCa4.2 fast gleich Sequenz wie kcnt1, fraglich ob wirklich bei existent!? | Genitaltrakt | nicht bekannt |

| Gen | Kanal | Gewebe | Funktion |
|-------|--|---|---|
| kcnv1 | Kv8.1, Modifizier / silencer kooperiert mit Kv2- Familien-Kanälen | kindliches und adultes Gehirn, Niere | nicht alleine funktionell!, aber wichtiger Modulator der Kv2- Familie Regulation der Membranpotential- und Aktionspotential- Frequenz durch Modulation des Stromflusses durch die verzögerten Gleichrichter, moduliert die Aktivität der Kv2.1 und Kv2.2 α -UE durch Änderung der Kinetik und Expressionshöhe und durch Verschiebung des Halb- Inaktivierungs-Potentials zu höher polarisierten Werten; |
| kcnv2 | Kv8.2 | Gehirn (laut Chipanalyse) | noch nicht bekannt |

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich in meiner Doktorarbeit
„cDNA-Microarray-Analyse von ZNS-Kaliumkanal defizienten Mäusen“
bei Abbildungen aus Journalen das Copyright von den Verlagen bzw. vom Autor
eingeholt habe. Bei Abbildungen aus dem Internet habe ich den entsprechenden Link
angegeben.

Würzburg, den

Unterschrift
(Vor- und Zuname)

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation
" cDNA-Microarray-Analyse von ZNS-Kaliumkanal defizienten Mäusen "
selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und
Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form
bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden
keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Unterschrift
(Vor- und Zuname)