

Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik,  
Abteilung Molekulare Bioanalytik und Bioelektronik

---

**Mikroarray-basierte Detektion von mRNA  
aus Zellen mittels On-Chip-PCR**

Dissertation zur Erlangung des Akademischen  
Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Universität Potsdam

von  
Xenia Marschan

Potsdam, den 27. Januar 2005

„Wir sind nichts als Reisende auf diesem Planeten, gekettet an einen winzigen Punkt im Raum, und dauern nur einen kurzen Augenblick. Dennoch ist der Geist des Menschen nicht nur in der Lage, Welten jenseits des Gesichtskreises des menschlichen Auges zu zählen, sondern auch die Ereignisse in den unendlichen Zeiten vor der Schöpfung zu verfolgen ...“

Sir Charles Lyell, Principles of Geology

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZIELSTELLUNG UND INHALT: .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
2.1	NACHWEIS VON mRNA – KLASSISCHE METHODEN ( <i>IN SITU</i> - HYBRIDISIERUNG, NORTHERN BLOT, DOT BLOT) .....	6
2.2	DNA-CHIP-TECHNOLOGIE / MIKROARRAYS .....	7
2.3	MIKROARRAY - TYPEN .....	9
2.4	ON-CHIP-PCR : VON DEN ANFÄNGEN BIS HEUTE .....	12
2.5	DAS C2C12-ZELLSYSTEM .....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
3.1	BEHANDLUNG DER GLAS-CHIPS UND KOPPLUNGSMETHODEN .....	17
3.1.1	Spotten auf der Oberfläche .....	17
3.1.2	Silanisierung .....	17
3.1.3	Kovalente Kopplung .....	18
3.1.3.1	EDC/Methylimidiazol – Methode .....	18
3.1.3.2	„Silanisierende Nukleinsäure“ – Methode .....	18
3.1.3.3	Kopplung auf Epoxy-Oberflächen .....	18
3.1.3.4	Blocken .....	19
3.1.4	Affine Kopplung .....	19
3.2	SCANNEN .....	20
3.3	ZELLKULTUR .....	21
3.4	ISOLIERUNG VON TOTAL RNA AUS ZELLEN .....	21
3.4.1	DNase -Verdau .....	22
3.4.2	Aufreinigung von RNA .....	22
3.4.3	Bestimmen der RNA-Konzentration und Reinheit .....	22
3.5	ISOLIERUNG DER MRNA AUS TOTAL RNA .....	22
3.6	REVERSE TRANSKRIPTION .....	23
3.7	RT –PCR .....	23
3.7.1	Two Step - RT – PCR .....	23
3.7.2	One Step - RT – PCR .....	24
3.7.2.1	Zwei-Enzym-Reaktion .....	24
3.7.2.2	Ein-Enzym-Reaktion .....	24
3.8	ON-CHIP-PCR .....	25
3.8.1	On-Chip-PCR mit M13-DNA .....	25
3.8.2	On-Chip-PCR mit cDNA .....	26
3.8.3	On-Chip - One Step –RT PCR .....	26
3.9	HYBRIDISIERUNG VON PCR-PRODUKTEN AUF DER CHIPOBERFLÄCHE .....	27
3.9.1	Asymmetrische PCR .....	27
3.9.2	Lambda-Exonuklease – Verdau zur Generierung von Einzelsträngen .....	27
3.9.3	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	27

3.9.4	Hybridisierung von einzelsträngigen PCR-Produkten.....	28
3.10	MATERIALIEN.....	29
3.10.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme.....	29
3.10.2	Zellen und Zellkultur.....	33
3.10.3	Glasträger und kommerzielle Slides für Mikroarrays.....	33
3.10.4	Oligonukleotide / Primer.....	34
	Für PCR mit <i>M13</i> -DNA.....	34
	Für PCR mit cDNA.....	35
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
4.1	ON – CHIP - PCR MIT <i>M13</i> –DNA.....	39
4.1.1	On – Chip - PCR an affin gekoppelten Primern.....	39
4.1.2	On – Chip - PCR an kovalent gekoppelten Primern.....	41
4.1.2.1	Chip-PCR mit kovalent gebundenen silanisierenden Primern.....	41
4.1.2.2	On-Chip-PCR auf Epoxy-Oberflächen.....	44
4.1.3	Konzentrationsgrenze des gespotteten Primers.....	45
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der On-Chip-PCR mit <i>M13</i> -DNA.....	48
4.2	ON – CHIP – PCR MIT CDNA.....	49
4.2.1	Überprüfen der RNA- Isolierung im Agarosegel.....	49
4.2.2	RT-PCR in der Flüssigphase.....	50
4.2.2.1	Amplifikation von Fragmenten aus verschiedenen Genen.....	50
4.2.2.2	PCR mit unterschiedlichen Matrizenkonzentrationen.....	54
4.2.3	Hybridisierung der PCR-Produkte an immobilisierten Sonden.....	55
4.2.4	On-Chip-RT-PCR.....	56
4.2.4.1	Singleplex –On Chip- RT- PCR.....	56
4.2.4.2	Optimierung der On-Chip-PCR.....	58
4.2.4.3	On Chip- RT- PCR an verschieden gespotteten Primerkonzentrationen.....	61
4.2.4.4	On Chip- RT- PCR mit verschiedenen cDNA-Matrizenkonzentrationen.....	64
4.2.4.5	Duplex –On Chip- RT- PCR.....	65
4.2.4.6	On Chip- RT- PCR mit verschiedenen cDNA-Matrizen.....	66
4.3	ONE STEP-RT-PCR.....	67
4.3.1	One Step-RT-PCR on Chip.....	68
4.3.2	One Step-RT-PCR mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen.....	71
4.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES mRNA-NACHWEISES ÜBER ON CHIP – PCR.....	72
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>73</b>
5.1	ON – CHIP - PCR MIT <i>M13</i> –DNA.....	73
5.1.1	Experimente mit verschiedenen Kopplungsmethoden.....	73
5.1.2	Eignung verschiedener PCR-DNA-Polymerasen.....	74
5.1.3	Nachweis der On-Chip-PCR-Produkte.....	75
5.1.4	Optimale Konzentration des gespotteten Primers bei EDC-Kopplung.....	76
5.2	PRINZIP DER ON-CHIP-PCR MIT EINEM FREIEN PRIMER.....	77
5.3	ON – CHIP - PCR MIT CDNA (ON-CHIP-RT-PCR).....	79
5.4	ONE STEP-RT-PCR ON CHIP.....	85
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>



<b>Anhang</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ii</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>iv-xiv</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	
<b>Erklärung</b>	

## 1 Zielstellung und Inhalt:

### Mikroarray-basierte Detektion von mRNA aus Zellen mittels On-Chip-PCR

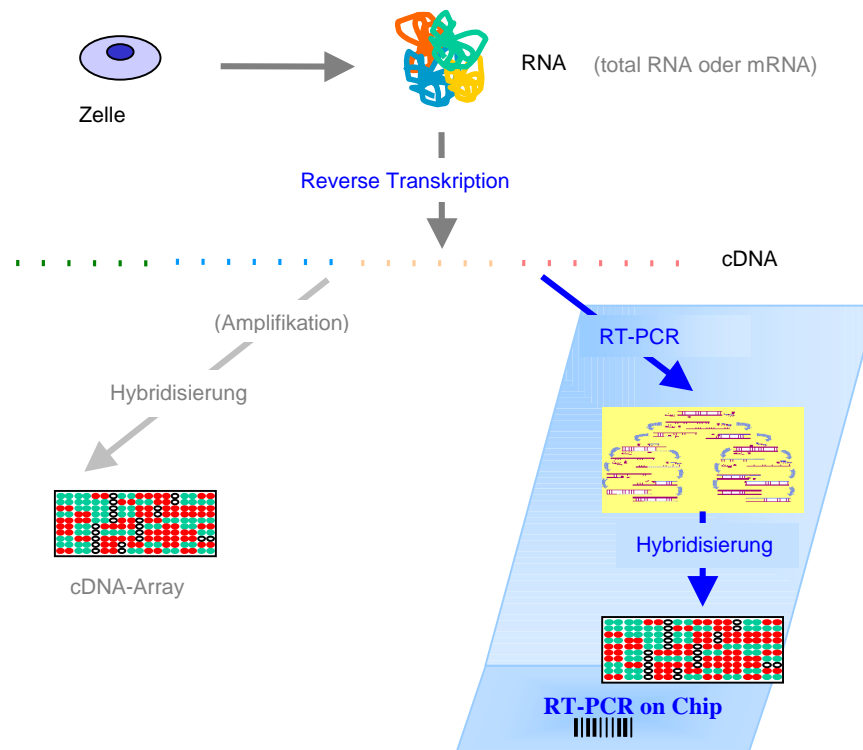
Für die klassischen Mikroarray – Experimente zur Genexpressionsanalyse wird fluoreszenz- oder radioaktiv-markierte cDNA oder RNA mit den immobilisierten Proben hybridisiert. Für ein gut detektierbares und auswertbares Ergebnis werden jedoch pro Array mindestens 15 – 20 µg Hybridisierungstarget benötigt. Das heißt, dass entweder 15 –20 µg RNA direkt durch Reverse Transkription in markierte cDNA umgeschrieben werden müssen oder bei Vorhandensein von weniger Startmaterial die RNA amplifiziert werden muss (Standard-Affymetrix-Protokolle, Klur et al. 2004). Oft sind damit zeit- und kostenintensive Probenpräparationen verbunden und das Ergebnis ist nicht immer reproduzierbar. Inzwischen gibt es einige Protokolle, die dieses Problem zu lösen versuchen (Zhang et al. 2001, Iscove et al. 2002, McClintick et al. 2003, Stirewalt et al. 2004).

Dennoch, eine optimale, leicht handbare und reproduzierbare Methode gibt es weiterhin nicht, weshalb in dieser Arbeit ein weiterer Lösungsansatz gesucht wurde.

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Methode kann aus einem geringen RNA-Gehalt das Vorhandensein eines spezifischen Gens über Amplifikation mittels On-Chip-PCR nachgewiesen werden (Abb.1).

Dazu wurde als erstes anhand eines Modellsystems untersucht, ob eine On-Chip-PCR mit fluoreszenz-markierten Primern möglich ist, um unmittelbar nach der Synthese die PCR-Produkte detektieren zu können. Als Modellsystem diente die zirkuläre DNA des *M13*-Phagen. In Optimierungsexperimenten wurde eine geeignete Kopplungsmethode ermittelt und dazu mit kovalent- und affin- immobilisierten Primern gearbeitet.

Für den Nachweis von mRNA aus Zellen wurde cDNA als Matrize für die On-Chip-PCR verwendet. Dieser Nachweis konnte schließlich als One-Step-RT-PCR auf einer Chipoberfläche weiterentwickelt werden.



**Abb. 1 Wege und Methoden zum Nachweis von mRNA über Mikroarrays**

Im klassischen Mikroarray-Experiment wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, ggf. amplifiziert und im letzten Schritt auf einem Array hybridisiert (hier dargestellt durch hellgraue Pfeile und Beschriftung im linken Teil der Abbildung). Die Amplifizierung und Hybridisierung können parallel in einem Schritt durch eine RT-PCR on Chip durchgeführt werden (blaue Pfeile und Beschriftung im rechten Teil der Abbildung).

## 2 Einleitung

### 2.1 Nachweis von mRNA – klassische Methoden (*in situ* - Hybridisierung, Northern Blot, Dot Blot)

Die Analyse von DNA, RNA und auch Proteinen mittels Auftrennungsmethoden wie Gelelektrophorese oder Gradientenzentrifugation gibt Aufschluss über die Größe und den Zustand (z.B. Homomer, Heteromer, Degradiertheit) der jeweiligen Moleküle, was vom Informationsgehalt für viele Anwendungen schon ausreichend sein kann. Die genaue Identität einer Probe, d.h. um welches Gen oder Protein es sich handelt, kann jedoch damit nicht geklärt werden. Für diese Fragestellung sind andere Methoden von Bedeutung. Hierzu zählen PCR-Analysen, Sequenzierungen und Hybridisierungen. Im folgenden werden einige Methoden, die auf Hybridisierung beruhen, näher vorgestellt.

Die DNA-Array-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren, wobei zwischen zwei Nukleinsäureeinzelsträngen jeweils die komplementären Basen durch Wasserstoffbrückenbindungen eine Paarung eingehen. Das Prinzip der Hybridisierung einer markierten Nukleinsäure zur Identifizierung von unbekanntem Nukleinsäurefragmenten wurde zuerst als *in situ* – Hybridisierung (ISH) (Pardue & Gall 1969, John et al. 1969) in Gewebeschnitten durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen lokalisiert werden. Dazu werden einzelsträngige Nukleinsäuren mit einer Markierung (z.B. Fluoreszenz, Chemilumineszenz, radioaktive Markierung) versehen und so als Sonden zum Hybridisieren eingesetzt. Die Verwendung fluoreszenz-gekoppelter Sonden wird als FISH-Methode bezeichnet.

1975 wurde von E.M. Southern eine Methode entwickelt, die den Transfer von isolierten Nukleinsäuren in synthetische Membranen mit anschließender Detektion erlaubt. Diese Methode, auch als Southern Blot bekannt, nutzt die Affinität von DNA-Molekülen aus, an Nylon- oder Nitrozellulose-Membranen leicht anzuheften, um diese durch Hybridisierung mit markierten komplementären Sonden identifizieren zu können. Diese Methode ist auch für RNA-Fragmente anwendbar (Alwine et al. 1977, 1979) und wurde in Anerkennung von E.M. Southern als Northern Blot / Hybridisierung benannt. Prinzip beider Methoden ist der Transfer von Nukleinsäurefragmenten aus einem Gel über Kapillarkräfte in eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran. Die Überführung kann auch über elektrophoretischen oder Vakuum-Transfer stattfinden. Nach dem Transfer wird die Membran gewaschen, anschließend werden die Nukleinsäuren durch Backen (bei 70-80°C, evtl. unter Vakuum) und Inkubieren in milden alkalischen Lösungen oder UV-Bestrahlung in der Membran fixiert. Die Membran bildet nun ein Spiegelbild des Agarose- oder Polyacrylamidgeles, aus dem die DNA- oder RNA-Moleküle übertragen wurden. Um diese identifizieren zu können, muss die

Membran mit markierten Sonden in Kontakt gebracht werden. Die Sonden können Oligonukleotide oder einzelsträngige Nukleinsäurefragmente wie RNA, cDNA oder ssDNA-Moleküle sein, die mit einem radioaktiven, einem Fluorophor- oder Biotin-Label markiert sind. Durch Hybridisierung dieser Sonden mit den komplementären Sequenzen der Probe in der Membran ist somit eine Identifizierung bzw. Adressierung des unbekanntes Nukleinsäurefragmentes nun möglich.

Northern Hybridisierungen werden genutzt, um die Konzentration, die Größe von RNAs sowie ihr Vorkommen im zu untersuchenden Gewebe zu messen. Der Northern Blot wurde somit zu einer Standardmethode in der Molekularbiologie. Eine Weiterentwicklung bildet die Dot- / Slot- Hybridisierung auf geladenen Membranen (Kafatos et al. 1979). Bei dieser Methode können verschiedene DNA- oder RNA-Präparationen auf einer Membran gleichzeitig fixiert werden.

Mikroarray-Experimente können dementsprechend als ein weiterer Fortschritt der zuletzt genannten Methode betrachtet werden, da sie nach den gleichen Prinzipien der Hybridisierung von fixierten Nukleinsäureproben mit entsprechenden Sonden ablaufen, jedoch ist die Informationsmenge eines einzigen Hybridisierungsexperimentes wesentlich größer.

## **2.2 DNA-Chip-Technologie / Mikroarrays**

Seit den neunziger Jahren hat die DNA-Chip- bzw. Mikroarray-Technologie die Sichtweise in Gene oder auch ganze Genome revolutioniert. Mit zunehmender Entwicklung der Genom-Sequenzierungsprojekte und der daraus resultierenden zunehmenden Menge an Sequenzdaten von ganzen Organismengenomen wie auch der vollständigen Aufklärung der Sequenz des menschlichen Genoms (Human Genome Project) sind für die weiteren Untersuchungen parallele Analyseverfahren gefragt, welche die Funktion von einzelnen Genen wie auch deren Zusammenspiel erkunden. Eine viel versprechende Methode zum Auffinden von Genen (Genemapping) in unterschiedlichen Zelltypen, Monitoring von Genexpressionsmustern sowie auch SNP-Analysen (Genotyping) stellt die Mikroarray-Technologie dar, die als Hochdurchsatz-Verfahren inzwischen mehr als 100.000 Gensequenzen (SNP-Chip von Affymetrix, 2004, Sentrix® BeadChip von Illumina) simultan in einem Experiment untersuchen kann.

Genexpressionschips werden bereits zur Klassifizierung histopathologisch und immunhistologisch schwer differenzierbarer maligner Melanome (Bittner et al. 2000), zur molekularen Klassifizierung von akuten Leukämieformen (Golub et al. 1999) und zur Differenzierung klinisch heterogener diffuser B-Zell-Lymphome („Lympho-Chip“ Alizadeh et al. 2000) eingesetzt.

Die DNA-Chip- Technologie soll in der Zukunft ein nützliches, leicht handhabbares und kostengünstiges Werkzeug innerhalb der medizinischen Diagnostik und Therapie darstellen,

um z.B. genetisch determinierte Krankheiten schnell zu erkennen oder die Wirkungsweise von Arzneimitteln *in situ* auf einem Chip statt in Tierversuchen zu testen (Pharmako-/Toxikogenomik). So können DNA-Chips auch der schnellen Identifizierung von pathogenen Bakterien und Viren dienen bzw. die Einordnung von unbekanntem Spezies oder Mutanten anhand der Hybridisierungsmuster mit bekannten Gruppen erleichtern.

Die Identifizierung von Organismen im Mikroarray-Format spielt auch für ökologische Analysen eine Rolle, wenn es z.B. darum geht, Indikatororganismen in Bodenproben aufzufinden und somit eine Aussage über den ökologischen Zustand des Bodens machen zu können („Umwelt-Chip“ – Projekt vom Land Bremen).

Ein weiteres Ziel in der Entwicklung von DNA-Chips besteht darin, die Vorgänge innerhalb einer Zelle auf noch kleinerem Raum nachzubilden („Lab-on-chip“). So können die DNA-modifizierenden Enzyme an immobilisierten Nukleinsäuren untersucht werden, um Aufschluss über die Enzymaktivität zu erhalten. Neuere Untersuchungen von Restriktionsenzymen (Bier et al. 2002, 2004) und Telomerasen (Schmidt et al. 2002) nutzten schon diese Möglichkeiten. Mit der „Lab-on-chip“-Technologie sollen somit zum einen weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel von komplexen Abläufen in und zwischen Zellen gewonnen werden, aber zum anderen auch die Prinzipien der Selbstorganisation (self assembling) von biologischen Molekülen für die Computer-Nanotechnologie ausgenutzt werden (Braun 1998, 1999; Niemeyer et al. 1999, 2001, 2002, 2003; Bier et al. 2002; Yan et al. 2003 ; Hölzel et al. 2003; Kukolka & Niemeyer 2004; Jianrong et al. 2004).

## 2.3 Mikroarray - Typen

Es gibt zwei verschiedene Mikroarray-Typen: das cDNA-Mikroarray und das Oligonukleotid-Mikroarray. Das cDNA-Mikroarray wurde als erstes im Brown-Labor der Stanford-Universität etabliert (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html> ; Schena et al. 1995). Hierbei werden cDNAs auf einer Oberfläche immobilisiert und als Sonden mit der zu untersuchenden DNA / cDNA oder RNA hybridisiert. Die cDNAs werden zuvor über PCR amplifiziert. Die meisten cDNA-Arrays werden je nach Fragestellung in den Laboren selbst hergestellt, was jedoch sehr aufwendig ist, da für ein Hochdurchsatzverfahren Tausende von PCR-Reaktionen durchgeführt und fürs Spotten gereinigt werden müssen. Die Reaktionen müssen auch so optimiert sein, dass die Amplifikate ähnliche Schmelztemperaturen und Größen (meist ca. 200 bp) aufweisen, um bei der späteren Hybridisierung keine unbeabsichtigten Präferenzen hervorzurufen. Dementsprechend stringent müssen die Primer ausgewählt werden.

Nachteil dieser Methode ist die oft noch vorherrschende hohe Fehlerrate (bis zu 38%), die vor allem durch Vermehrung der cDNA-Sequenzen in bakteriellen Plasmiden (durch Kontamination von Klonen), aber auch Kreuzhybridisierungen, alternatives Splicing oder Sequenzierfehler verursacht wird (Halgren et al. 2001; Quackenbush 2002 ; Lee et al. 2003).

Der zweite Mikroarray-Typ ist das Oligonukleotid-Mikroarray. Bei dieser Methode werden Oligonukleotide oder PNAs (Peptide nucleic acid) entweder direkt auf einem Chip (*in situ*) synthetisiert oder erst nach der Synthese auf einem Chip immobilisiert und dann mit einer oder mehreren DNA/cDNA- oder RNA- Targets hybridisiert. Komplementäre Sequenzen können so identifiziert werden. Diese Methode wurde von der Firma Affymetrix Inc. entwickelt, die dazu auch als Hauptanbieter Produkte vertreibt (<http://www.affymetrix.com> ; Lockhart et al. 1996). Die kommerziellen Oligonukleotid-Arrays werden *in situ* (siehe Beschreibung unten zu fotolithografischem Verfahren) entsprechend der Fragestellung (z.B. Untersuchen des Hefe-, Maus- oder Humangenomes) hergestellt. Dabei wird jedes Hybridisierungssignal pro mRNA durch ein Cluster von bis zu 20 Oligonukleotidpaaren realisiert, wobei jedes Oligonukleotidpaar aus einer perfekten Basenpaarung (perfect match) und einer Einzelbasen-Misspaarung (single-base mismatch) besteht. Das Gesamtsignal für die jeweilige mRNA wird aus der Differenz der Hybridisierungssignale zwischen dem perfect match und dem single-base mismatch bestimmt.

Der Affymetrix GeneChip stellt ein solches kommerziell häufig angewandtes Oligonukleotid-Array dar, das 6500 verschiedene Gene repräsentiert, die wiederum durch bis zu 20 verschiedene 25mer-Oligonukleotid-Proben dargestellt werden (Lockhart et al. 1996, Lipshutz et al. 1999). Die GeneChips haben eine Falschpositiv-Fehlerrate von nur 1-2 %

(Lipshutz et al. 1999, Lee et al. 2001). Jedoch bei der Analyse von 10.000 Genen entsprechen 1% immer noch 100 falschpositiven Aussagen (Quackenbush 2002).

Die Analyse der zu untersuchenden DNA- oder RNA- Spezies erfolgt bei beiden Arraytypen durch Hybridisierung. Die DNA, cDNA oder RNA wird dafür mit einem Fluorophor oder radioaktiv markiert und kann mit entsprechenden Scannern detektiert werden.

Zur Zeit werden als Trägersubstrate für Mikroarrays Objektträger aus Glas, Nylon- / Nitrozellulose- Membranen (Saiki et al. 1989), Polyacrylamid beschichtet auf Glas (Mitra & Church 1999) oder Polyesterin (Nikiforov & Rogers 1995) verwendet. Glas hat den Vorteil, dass es gegenüber hohen Temperaturen und sauren oder basischen Substanzen widerstandsfähig ist. Des weiteren besitzt es eine geringe Eigenfluoreszenz und minimiert so die Hintergrundsignale. Um die RNA-Levels zweier verschiedener RNA-Proben zu vergleichen, kann jede mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden und zusammen mit der anderen RNA-Probe auf das Array gebracht werden. Durch diese Cohybridisierung konkurrieren die beiden RNA-Populationen um die gleichen Sonden. Die Messung des Verhältnisses beider Signalintensitäten ermöglicht dann eine semi-quantitative Aussage über die Menge des jeweiligen Transkripts (Duggan et al. 1999). Nylonmembranen dagegen sind meist auf eine serielle oder parallele Hybridisierung beschränkt (Cheung et al. 1999).

Das Immobilisieren der verschiedenen Sonden (Oligonukleotide oder cDNAs) wird meist durch kovalente Bindung auf der Oberfläche realisiert. Für das Aufbringen der Mikroarrays durch Spotten werden allgemein drei Verfahren unterschieden:

1. Fotolithografisches Verfahren, bei dem die Sequenz *in situ* auf dem Glasträger synthetisiert wird. Dabei werden fotolabile Schutzgruppen durch UV-Licht, das selektiv durch eine fotolithografische Maske strahlt, ortsorientiert für die Oligosynthese aktiviert. Auf das Glassubstrat wird dann ein spezifisches fotolabil-modifiziertes Nukleotid gegeben, das an die vorher definiert aktivierten Arraystellen bindet. Durch Aneinanderreihen dieses Vorgangs mit verschiedenen fotolithografischen Masken wird das entsprechende Oligonukleotid an den jeweils definierten Arraypunkten generiert (Fodor 1991, McGall et al. 1996, Lockhart et al. 1996, Lipshutz et al. 1999). Nachteil dieser Methode ist, dass sie sehr kostenintensiv und arbeitsaufwendig für den einzelnen Anwender ist.

2. Mechanisches Microspotting (Kontaktverfahren), bei dem zuvor synthetisierte Sonden (cDNA oder PCR-Produkt) bzw. Oligonukleotid-Sonden durch einen Spotting-Roboter mittels Mikrokapillaren direkt auf die Trägeroberfläche gedruckt werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass die Oberfläche beschädigt werden kann. Desweiteren werden durch den direkten Kontakt mit der Oberfläche ungleichmäßige Spots erzeugt, die ein Problem beim Auswerten darstellen können.



3. Piezo- / Ink Jetting ermöglicht ein kontaktloses Spotten. Die Sonde wird aus einer Mikrodüse durch einen Impuls (Piezo- oder Inkjet) aufgesprüht. Nachteil hierbei können die hohen Scherkräfte sein, welche die DNA oder auch den Druckkopf beschädigen können.

In Tab.1 sind die Mikroarrayer beschrieben, die für die Arbeit zur Verfügung standen.

**Tab. 1 Am IBMT verwendete Mikroarrayer**

„Microarrayer“ (Hersteller)	Tropf- verfahren	Tropfen- volumen	Tropfen- radius (*)	Positionier- genauigkeit	Vorteile
"Piezo-Tip" (GeSiM GmbH Großerkmannsdorf, Dresden)	Ink-Jet (Piezo-Tip)	10pl - 1nl	150µm- 250µm	15µm- 20µm	◇ schnelle Anfahrgeschwindigkeiten ◇ bis zu 20 Slides gleich- zeitig
"Fused-Silica- Kapillare" ("Probot" bioanalytical instruments bai GmbH Lautertal)	Kontakt- verfahren „Kapillare“	10nl-1µl	200µm- 300µm	<10µm	◇ hohe Positioniergenauigkeit ◇ für alle Lösungsmittel geeignet
<u>TopSpot</u> (HSG- IMIT- Villingen- Schwenningen; IMTEK- Freiburg)	Ink-Jet	500pl- 800pl	200µm- 250µm	<20µm	◇ bis zu 40 Slides gleichzeitig ◇ Siltultanübertragung ganzer Titerplatten ◇ Qualitätskontrolle
„ <u>Hand-Arrayer</u> “ (Schleicher & Schuell GmbH, Einbeck)	Kontakt- verfahren (pin, Stempler)	100nl- 500nl	400µm- 500µm	500µm- 1mm	◇ für alle Lösungsmittel geeignet ◇ einfach u. solide zu handhaben

\* Der Tropfenradius ist abhängig von der zu bespottenden Oberfläche, d.h. auf einer hydrophoben Oberfläche ist der Tropfenradius kleiner als auf einer hydrophilen Oberfläche.

## 2.4 On-Chip-PCR : Von den Anfängen bis heute

Bis es zur Amplifikation an einer Festphase kam, war das Ziel zunächst die Amplifikation von DNA-Sequenzen in kleinen Reaktionsvolumina. Durch Miniaturisierung von Reaktionskammern können kleinere Volumina an Reagenzien bis in den Nanoliterbereich eingesetzt werden, wodurch eine schnellere Reaktionsrate erreicht wird. Außerdem werden so weniger Ausgangsmaterialien wie z.B. DNA-Proben benötigt, was für medizin-diagnostische Analysen einen enormen Vorteil darstellt, da dort oft nur eine begrenzte Probenmenge (z.B. Gewebe) zur Verfügung steht. So veröffentlichte die Arbeitsgruppe von J. Cheng und G.E. Hvichia dazu 1995 ihre Ergebnisse, die eine PCR in 10 $\mu$ l-Mikroreaktionskammern aus Silikon auf einer Chipoberfläche beschreibt. Die Chipoberfläche bzw. Reaktionskammer muss gegenüber den Bedingungen während einer PCR - vor allem den sich ständig wechselnden Temperaturbedingungen - widerstandsfähig sein und darf aber auch nicht inhibitorisch auf die Reaktion einwirken. Dabei zeigte sich, dass unbehandeltes Silikon die PCR-Reaktion inhibiert und nur bestimmte behandelte Silikone eine Reaktion wie in einem konventionalem Polyethylen-Reaktionsgefäß („Eppendorf-Gefäß“) ermöglichen. Die Silanisierung von Silikon- und Glasoberflächen bildet eine Möglichkeit, um die inhibitorischen Effekte zu eliminieren. Als weitere Möglichkeit wird eine Oxidbeschichtung vorgeschlagen (Cheng & Hvichia 1995). Heutige Anwendungen zeigen, dass sich weitestgehend die Silanisierungsmethode durchgesetzt hat.

Durch gleichzeitige Miniaturisierung des Detektionsapparates kann ein sog.  $\mu$ TAS (micro total analysis system) geschaffen werden. Inzwischen gibt es einige Systeme, die Synthesereaktionen und Detektion im Mikromaßstab ermöglichen (Kricka 2001). Als Beispiele für die Anwendung solcher Mikrosysteme seien Immunoassay (Song et al. 1994, Koutny et al. 1996, Chiem et al. 1998), Kapillarelektrophorese (Colyer et al. 1997, Mangru et al. 1998, Cheng et al. 1998), PCR (Belgrader et al. 1998, Ibrahim et al. 1998, Kopp et al. 1998, Ross et al. 1998, Shoffner et al. 1998, Cheng et al. 1998, Waters et al. 1998, Wilding et al. 1998, Dunn et al. 2000), LCR (ligase chain reaction) (Cheng et al. 1995) und RT-PCR (Obeid et al. 2003) genannt.

Die oben beschriebenen Systeme gelten für Reaktionen mit frei in Lösung vorliegenden Reaktionspartnern. Die Entwicklung von Blot-Hybridisierungstechniken, einschließlich Mikroarrays führte Reaktionspartner ein, die nicht frei in Lösung vorliegen, sondern an einer Oberfläche immobilisiert sind. Erste Reaktionen an immobilisierten Nukleinsäuremolekülen waren Sequenzierungsreaktionen (Rosenthal et al. 1985, Zhang et al. 1987, Stahl et al. 1988, Jones et al. 1991, Kaneoka et al. 1991, Ikonen et al. 1992, Rolf & Weber 1994, Ohara et al. 1997, Pastinen et al. 1997, Dubiley et al. 1999) und Primerextensionsreaktionen (Shumaker et al. 1996, Köster et al. 1996, Fu et al. 1998, Kurg et al. 2000, Pastinen et al. 2000, Pirrung et al. 2001). Tang et al. (1999) beschreibt eine Methode zur Primerextension („PROBE“ =

primer-oligo base extension), bei der einzelsträngiges PCR-Produkt kovalent auf einer Chipoberfläche immobilisiert und in einem 1,5 µl-Volumen eine Reaktion mit Primern, Nukleotiden und dem Enzym durchgeführt wird. Der Nachweis des verlängerten DNA-Stranges erfolgt durch MALDI-MS. Auf diesem Prinzip der Verlängerung von DNA-Strängen oder Oligonukleotiden beruhen viele SNP-Analysen (Shumaker et al. 1996, Pastinen et al. 2000, Erdogan et al. 2001).

Bei der zuvor beschriebenen Methode kommt es jedoch noch zu keiner Amplifikation von DNA-Sequenzen. Sogenannte Festphasen-Amplifikationen („solid phase DNA amplification“) werden seit Mitte der 90er Jahre an verschiedenen Oberflächen beschrieben.

Parallel zur Festphasen-Amplifikation auf Chipoberflächen wurden auch Methoden an Mikrosphären bzw. Beads entwickelt (Andreadis & Chrisey 2000, Shapero et al. 2001).

Als erstes wurde mit Festphasen-Amplifikationen mittels immobilisierter Primer in Mikrotiterplatten gearbeitet (Kohasaka & Carson 1994, Rasmussen et al. 1994, Oroskar et al. 1996). Andere Gruppen (Mitra & Church 1999, Strizhkov et al. 2000, Tillib et al. 2001) arbeiteten mit Polyacrylamid beschichteten Glasoberflächen. In dieser Polyacrylamidschicht – in sog. Nanoliter-Gelpads - werden Primer für die PCR-Synthese immobilisiert. Die weiteren Komponenten der PCR gelangen durch Diffusion in die Gelmatrix. Nach der PCR-Reaktion werden die Produkte durch Anfärben mit DNA-Farbstoffen (Mitra & Church, 1999), Hybridisieren mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonden (Strizhkov et al. 2000, Tillib et al. 2001) oder direktem Einbau von fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden detektiert (Strizhkov et al. 2000). Bei der Verwendung von Gelpads ist eine spotgenaue Trennung der immobilisierten Primer sowie Produkte nicht möglich bzw. erfordert speziell hergestellte Oberflächen (hydrophobe Abtrennungsbereiche). Die Lösung dieses Problems konnte aus der sich entwickelnden Mikroarraytechnik entnommen werden. Verschiedene Arten der Kopplungschemie zusammen mit den Spottingverfahren ermöglichen eine ortsgenaue Auflösung der Immobilisate bis in den Nanometerbereich.

Die On-Chip-PCR verlangt drei Hauptbedingungen für die Kopplung der Primer: erstens muss die Kopplung den wiederholten Heiz- und Kühlzyklen standhalten, zweitens muss der Primer an seinem 5'-Ende immobilisiert werden, da die DNA-Polymerase nur an freien 3'-OH-Enden synthetisieren kann und drittens muss die immobilisierte Primerdichte ausreichend hoch für eine Detektion der gebildeten PCR-Produkte sein. In der Arbeit von Adessi et al. (2000) werden verschiedene Kopplungsmethoden für eine anschließende On-Chip-PCR verglichen. Als geeigneteste Methode wird die Kopplung von 5'-Thiol-modifizierten Primern mit s-MBS (*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysulfo-succinimide ester) heterobifunktionalen Crosslinkern auf aminosilanisierten Glasoberflächen ermittelt. Aber auch die EDC-Kopplung gilt als genügend stabil. Als optimale Primerkonzentration zum Immobilisieren nach der erstgenannten Methode werden 50 µM empfohlen, was einer Belegungsdichte von 15 fmol/mm<sup>2</sup> entspricht. Bemerkenswert an der genannten Arbeit ist, dass der Vorwärts- und

Rückwärtsprimer immobilisiert wurde und somit kein freier Primer in Lösung für die PCR zur Verfügung stand. Während der ersten Zyklen kommt es somit auch nur zu einer Verlängerung der immobilisierten Primer („interfacial amplification“). Die verlängerten Stränge hybridisieren danach über Brückenbildung an ihren 3'-Enden mit den benachbart immobilisierten komplementären Primern und dienen nun neben den freien DNA-Molekülen auch als Matrize für die PCR-Synthese („surface amplification“). Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv- bzw. fluoreszenzmarkierten Sonden.

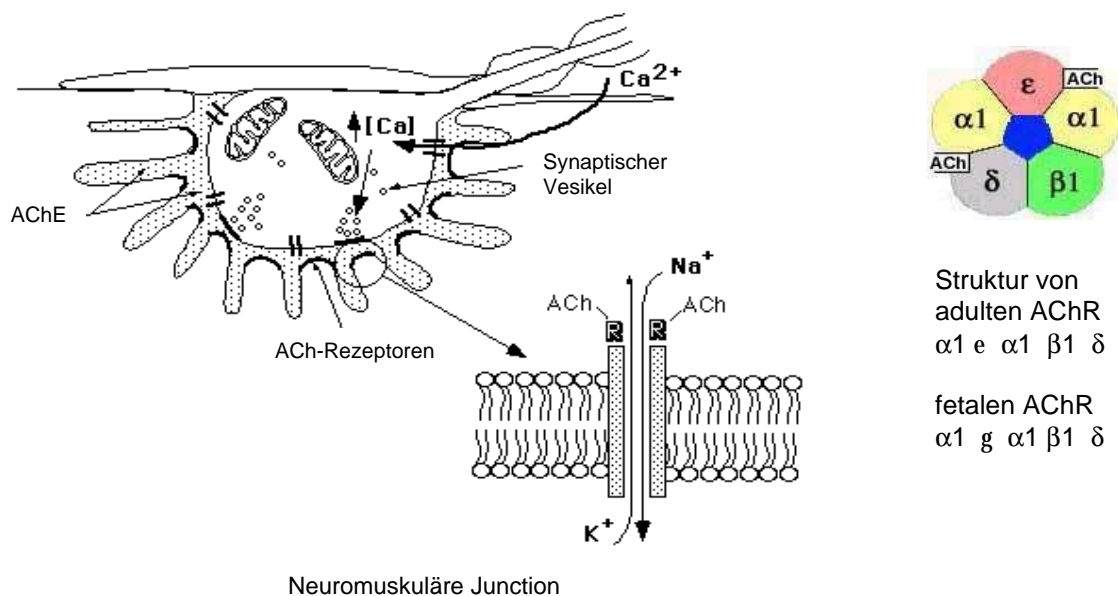
Neueste Veröffentlichungen beschreiben jedoch Protokolle, bei denen zusätzlich freie Primer in Lösung im PCR-Ansatz enthalten sind, um eine größere Amplifikationseffizienz zu erreichen (Tillib et al. 2001, Huber et al. 2002, Mitterer et al. 2004).

Die Methode der On-Chip-PCR an immobilisierten Primern konnte schon für die Aufdeckung von SNPs (Huber et al. 2001, 2002), Identifizierung von Bakterien in klinischen Proben (Mitterer et al. 2004) sowie Amplifikation von langen PCR-Fragmenten (Nickisch-Roseneck, Marschan et al. 2004) genutzt werden.

## 2.5 Das C2C12-Zellsystem

Für diese Arbeit wurde RNA aus C2C12-Zellen isoliert. Die C2C12-Zellen sind ein Subklon einer Myoblasten-Zelllinie aus Mausmuskelzellen. Nach der Proliferationsphase differenzieren sie sich sehr schnell (innerhalb von 4 - 6 Tagen), bilden dann kontraktile Myotubuli und produzieren charakteristische Muskelproteine. Die Differenzierung geschieht normalerweise nach Kontakt der Zellen untereinander, kann aber auch durch Zugabe von z.B. Pferdeserum initiiert werden.

Zu den charakteristischen Muskelproteinen gehören u.a. die Acetylcholinrezeptoren (AChR), die innerhalb von motorischen Neuronen, d.h. für die Weiterleitung von Nervenpotentialen zu Muskelzellen, wichtig sind. In Abb.2 ist das Zusammenspiel der Acetylcholinrezeptoren mit ihrem Liganden - dem Acetylcholin (ACh) - sowie der Aufbau des Acetylcholinrezeptorproteins dargestellt.



**Abb. 2 Funktion und Aufbau des Acetylcholinrezeptors**

Acetylcholinrezeptoren sind in der postsynaptischen Membran innerhalb von synaptischen Spalten (neuromuskulären Junctions) lokalisiert und binden dort das Transmittermolekül Acetylcholin, das zur Weiterleitung eines Aktionspotentials aus den synaptischen Vesikeln freigesetzt wird. Das Aktionspotential wird durch den Anstieg der zytosolischen Kalziumionen-Konzentration hervorgerufen. Durch den gebildeten Rezeptor-Liganden-Komplex (AChR-ACh) werden u.a. Natriumionen-Kanäle geöffnet – die durch die Anordnung der Rezeptoruntereinheiten (siehe blauer Bereich in Abb.2) sich formen -, sodass Natrium-Ionen in die postsynaptische Membran der Muskelzelle einströmen können. Durch

den Einstrom der Natrium-Ionen wird die postsynaptische Membran depolarisiert und dadurch ein Muskel-Aktionspotential ausgelöst.

Die Kommunikation zwischen Nerven und Muskeln durch extrazelluläre Matrixproteine, den Zelloberflächenproteinen, ist ein zentraler Prozess. Durch diese Interaktionen wird die Mobilisation von Muskelproteinen – wie z.B. AChR und muskelspezifischen Kinasen – auf Seite der Motorneuronen ausgelöst und die Transkription von synapsenspezifischen Genen für weitere neuromuskuläre Proteine initiiert (Sanes & Lichtman 1999, Burkin et al. 2000).

Der Acetylcholinrezeptor in Muskelzellen besteht aus 5 Untereinheiten – zwei  $\alpha$ 1-Untereinheiten, einer  $\beta$ 1- und einer  $\delta$ -Untereinheit sowie einer  $\epsilon$ -Untereinheit bei adultem AChR oder der  $\gamma$ -Untereinheit bei fetalem AChR. In bisherigen Untersuchungen konnten die Gene für die  $\alpha$ 1 (Chrna1)-,  $\beta$ 1 (Chrnb1)- sowie  $\gamma$  (Chrng)- Untereinheiten als deutlich exprimierte Transkripte identifiziert werden (Portier et al. 1999, Moran et al. 2002). Dagegen ist die  $\epsilon$  (Chrne)- Untereinheit erst ab dem 8. Differenzierungstag detektierbar (Portier et al. 1999).

Die Untersuchung des Acetylcholinrezeptors bzw. seiner Gene gibt Einblicke in die noch nicht vollständig verstandenen Mechanismen der Signalweiterleitung in Neuronen. Da dieser Rezeptor mit seinen Transmitterstoffen nicht nur in neuromuskulären Junctions vorkommt, sondern auch in den zerebralen Neuronen, erhofft man sich zugleich ein besseres Verständnis der Neuroregulation im Gehirn zu erhalten. Dadurch könnten weitere Behandlungsansätze für neurodegenerative Krankheiten wie der Alzheimer Krankheit oder der Autoimmunkrankheit Myasthenia Gravis (MG) (Heckmann et al. 1996) gefunden werden.

Neben den Genen des Acetylcholinrezeptors aus Muskelzellen wurden von drei weiteren charakteristischen Proteinen, die während der Muskeldifferenzierung aus Myoblasten gebildet werden, die Gene in die Fragestellung dieser Arbeit einbezogen : die muskelspezifische Creatinkinase (Ckm), eine ATPase (Atp2a2) und Myogenin (Myog).

Als Kontroll-Zellsystem wurden in dieser Arbeit L929-Zellen (Maus-Fibroblasten-Zelllinie) verwendet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Behandlung der Glas-Chips und Kopplungsmethoden

##### 3.1.1 Spotten auf der Oberfläche

Zum Spotten wurden folgende Mikroarrayer verwendet: TopSpot, Nanoplotter und Probot. Die technischen Details sind in Tab.2 aufgeführt. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots beträgt bei den TopSpot- und Nanoplotter- gespotteten Arrays 500  $\mu\text{m}$ , beim Probot 1000  $\mu\text{m}$ .

Tab. 2 Verwendete Mikroarrayer

„Mikroarrayer“ (Hersteller)	Tropfverfahren	Tropfen- volumen	Tropfen- radius	Positionier- genauigkeit (*)	Vorteile
Nanoplotter "Piezo-Tip" (GeSiM GmbH Großerkmannsdorf, Dresden)	Ink-Jet (Piezo-Tip)	10pl - 1nl	150 $\mu\text{m}$ -250 $\mu\text{m}$	15 $\mu\text{m}$ -20 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schnelle Anfahrsgeschwindigkeiten</li> <li>• bis zu 20 Slides gleichzeitig</li> </ul>
"Fused-Silica-Kapillare" ("Probot" bioanalytical instruments bai GmbH Lautertal)	Kontakt- verfahren „Kapillare“	10nl-1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{m}$ -300 $\mu\text{m}$	<10 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hohe Positioniergenauigkeit</li> <li>• für alle Lösungs-mittel geeignet</li> </ul>
TopSpot (HSG-IMIT- Villingen-Schwenningen; IMTEK- Freiburg)	Ink-Jet	500pl-800pl	200 $\mu\text{m}$ -250 $\mu\text{m}$	<20 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bis zu 40 Slides gleichzeitig</li> <li>• Simultanübertragung ganzer Titerplatten</li> <li>• Qualitätskontrolle</li> </ul>

\* Der Tropfenradius ist abhängig von der zu bespottenden Oberfläche, d.h. auf einer hydrophoben Oberfläche ist der Tropfenradius kleiner als auf einer hydrophilen Oberfläche.

##### 3.1.2 Silanisierung

In dieser Arbeit wurden Objektträger aus Glas verwendet, deren Oberfläche zur Reinigung für 40 sec in Piranha-Lösung (= Carosche Säure: 10% Wasserstoffperoxid in 96% Schwefelsäure) getaucht und anschließend sorgfältig mit Wasser gespült (Bilitewski et al., 1998) wurden. Danach wurde die Oberfläche mit 10 M NaOH für 2 h aktiviert. Nach einem Spülschritt in bidestilliertem Wasser wurden die Chips mit 10 % wäßriger 3-Aminopropyl-triethoxysilan-Lösung (APTES, Fluka, Selze) (pH 3,45 / HCl) für 2 h bei 80°C inkubiert.

Anschließend wurden die Chips wieder gründlich mit Wasser gewaschen, 10 min bei 500 rpm/ min trocken zentrifugiert und abschließend bei 120°C im Trockenschrank für mind. 1h gebacken.

### **3.1.3 Kovalente Kopplung**

#### **3.1.3.1 EDC/Methylimidiazol – Methode**

In den Standardexperimenten wurden die Arrays mit 30-50 µM-Primerlösungen gespottet. Für die kovalente Kopplung nach der EDC-Methode (Violetta and Swaisgood, 1982) wurden die Primerlösungen mit 30 mM 1-Methylimidiazol (pH 6,0 / HCl), 5mg/ml EDC , 25% DMSO gelöst und anschließend gespottet. Die gespotteten Chips wurden vor der Weiterverarbeitung für mind. 4 Tage trocken bei Raumtemperatur gelagert.

#### **3.1.3.2 „Silanisierende Nukleinsäure“ – Methode**

(modifiziert nach Kumar et al., 2000)

Diese Kopplungsmethode wurde nach einem abgeänderten Protokoll von Kumar et al. (2000) durchgeführt. Dazu wurden 5'-aminierte Primer mit Isocyan-Silan in Verbindung gebracht: zu 100 µl DMSO wurden 15 µl 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan (Fluka) und 10 µl Primerlösung gegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 300 rpm geschüttelt und anschließend wurden 175 µl 500 mM Na-Acetat (pH 5,0) zugegeben. Die klare Lösung wurde vor dem Spotten noch 10 min geschüttelt. Das Spotten erfolgte sofort danach am Probot. Als Spottingoberflächen wurden silanisierte oder nur NaOH-aktivierte Glas-Chips verwendet.

Die gespotteten Chips wurden vor der Weiterverarbeitung mit 1x SSC-Puffer und destilliertem Wasser gespült.

#### **3.1.3.3 Kopplung auf Epoxy-Oberflächen**

Es wurden Glasobjektträger mit Epoxybeschichtung verwendet, die von der Firma Eppendorf bis 2002 als CreativeChip® -Oligo und -PCR Slides angeboten wurden. Diese Chips waren für Mikroarrayexperimente mit gespotteten Oligonukleotiden oder PCR-Produkten ausgerichtet. Die Oberfläche ist für das Koppeln von aminierten Nukleotiden optimiert, durch Backen für 30 min bei 120°C nach dem Spotten können aber auch unmodifizierte Oligonukleotide oder PCR-Produkte immobilisiert werden.

In dieser Arbeit wurden aminierte Primer auf diesen Oberflächen gekoppelt.

Vor Verarbeiten der gespotteten Chips wurden diese weiterbehandelt und geblockt nach empfohlenem Protokoll für diese Chips (Eppendorf-Protokoll) oder wie oben für die EDC-



Methode beschrieben. Beide Behandlungsmethoden erbrachten gute Signalintensitäten mit geringem Hintergrund.

### 3.1.3.4 Blocken

Chips mit kovalent gekoppelter DNA wurden nach DeRisi et al. (1997) behandelt. Unmittelbar vor der Applikation erfolgte ein Hydratisieren der Spots durch Eintauchen der Chips in 65°C-warme 3x SSC+0.2% SDS-Lösung für 5-10 min. Nach Spülen der Chips mit destilliertem Wasser wurden sie bei 600 rpm für 5 min trocken zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Blockingschritt mit folgender Lösung: 500 mg Bernsteinsäureanhydrid gelöst in 35 ml 1-methyl-2-pyrrolidinone (Aldrich) und 1,5 ml 1M Borsäure (pH 8,0). Die Chips wurden unter leichtem Schütteln für 30 min in dieser Lösung geblockt. Danach wurden sie gründlich mit destilliertem Wasser gespült und trocken zentrifugiert.

#### Waschen nach Reaktion

Nach den Reaktionen wurden die Chips jeweils 10 min in 6x SSC, 0.01% SDS-Lösung, danach in 0.05x SSC-Lösung gewaschen und abschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 500 rpm wurden die Chips getrocknet.

### 3.1.4 Affine Kopplung

Die affine Kopplung erfolgte über Bindung 5'-biotinylierter Oligonukleotide auf Avidin-, Neutravidin- bzw. Streptavidin-beschichteten Glasobjektträgern. Dazu wurden wässrige Lösungen in einer Konzentration von 0,2 mg/ml auf silanisierten Glasoberflächen für 2h inkubiert. Nach Spülen der Glaträger mit Wasser und Trockenzentrifugieren für 10 min bei 500 rpm wurden die Chips bei Raumtemperatur staubfrei und dunkel gelagert. Die Lagerungszeit für erfolgreiche Experimente betrug 2-6 Monate. Als genügend thermisch stabil für die On-Chip-PCR-Reaktionen erwiesen sich nur die Streptavidin-Oberflächen und in geringerem Maße die Neutravidin-Oberflächen.

Nach dem Spotten der 5'-biotinmodifizierten Oligonukleotide wurden die Chips in einer feuchten Kammer für mind. 24h gelagert und unmittelbar vor der Anwendung mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Nach der Reaktion wurden die Chips mit bidestilliertem Wasser für 10 min gespült und nach Trockenzentrifugieren (5 min / 500 rpm) gescannt.

### 3.2 Scannen

Die Arrays wurden hauptsächlich am ArrayWorx- Scanner (ArrayWoRx e, Applied Precision, Issaquah, WA, USA) gescannt. Die Scans erfolgten unter folgenden Einstellungen :

Auflösung: 97.560 (Kantenlänge eines Pixels 9,756  $\mu\text{m}$ )

Belichtungszeit: 0.3 sec bei 682 nm-Emissionswellenlänge (Cy5) oder  
0.1 sec bei 595 nm-Emissionswellenlänge (Cy3, TRITC)

Empfindlichkeit: High SNR

Einige Scans wurden am Affymetrix-Scanner (ArrayScanner GSM 428) durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität der Spots wurde mit der ImaGene<sup>TM</sup>-Software (BioDiscovery) ermittelt. Die TIF-Daten (Rohdaten) des Scans wurden in die Software eingelesen. Nach dem Erstellen eines Grids (Festlegen der Spotpositionen und -größen innerhalb eines Arrays) wurden von der Software die Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots durch Bildung des Mittelwertes über alle Pixel des Spots (Mean) errechnet.

### 3.3 Zellkultur

Die *C2C12*- Zellen wurden am AMBT Berlin kultiviert.

Dazu wurden in 7x75cm-Kulturflaschen  $2 \times 10^4$  Zellen in Kulturmedium (DMEM mit HEPES (Sigma D6171); 10% FCS (UV-inaktiviert, Biochrom S0115); 4mM L-Glutamin (Biochrom K0280); 0,1mg Gentamycinsulfat (Biochrom A2712) eingesät. Für die Gewinnung undifferenzierter Zellen wurden die Zellen 4 Tage bis zu max. 60-70% Konfluenz wachsen gelassen. Differenzierte Zellen wuchsen 10 Tage bis zur einer gleichmäßigen Ausdifferenzierung. Nach Entfernen des Kultivierungsmediums wurde der Zellrasen zweimal mit 3 ml Hank's-Puffer (Biochrom L2035) oder PBS-Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Biochrom L1825) gespült. Die Zellen wurden durch Behandlung mit 0,5 ml Trypsin / EDTA in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (0,05% / 0,02%, Biochrom L2143) bei 37°C für 8 min oder durch Abschaben mit einem Zellschaber von der Bodenfläche gelöst. Die Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen übergeführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet nochmals gewaschen und mit 0,5 ml Puffer in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80°C gelagert oder sofort anschließend die RNA isoliert.

Die *L929*-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 0,1mg Gentamycin, 2mM L-Glutamin und 5% FCS kultiviert. Je  $0,5 \times 10^5$  Zellen wurden in eine Kulturflasche mit 37°C-vortemperierten Medium eingesät und 2-3 Tage bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert, dann das alte Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach insgesamt 8 Tagen Kultivierungszeit wurden die Zellen umgesetzt. Die Zellernte erfolgte durch Abschaben der Zellen von der Zelloberfläche. Die Zellen wurden bei –80°C aufbewahrt.

### 3.4 Isolierung von total RNA aus Zellen

Die Total-RNA wurde nach der Trizol-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) isoliert. Dazu wurden max.  $5 \times 10^6$  Zellen mit 1 ml TRI-Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc.) lysiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur waren die Zellen homogenisiert und wurden mit 100µl Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde kurz gevortext, anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige farblose Phase mit der RNA wurde in ein steriles RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 500µl Isopropanol. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung 15 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in max. 50µl DEPC-Wasser 10 min bei 60°C gelöst.

### 3.4.1 DNase -Verdau

Um mögliche Verunreinigungen mit DNA auszuschließen, musste für einige nachfolgende Reaktionen die RNA mit DNase I behandelt werden. Dazu wurde die RNA-Probe (1 $\mu$ l pro 1 $\mu$ g RNA) bei 37°C für 30 min inkubiert.

### 3.4.2 Aufreinigung von RNA

Nach dem DNase – Verdau muss die RNA für nachfolgende Reaktionen gereinigt werden. Zu der Probe wurden das halbe Volumen Phenol – Chloroform zugegeben und 10 min bei 14.000g zentrifugiert. Die obere Phase in ein RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1/10 Volumenanteil 2M Natriumacetat (pH 5,2) und einem Volumenanteil Isopropanol versetzt. Die Fällungsreaktion erfolgte bei –80°C für mindestens 2 Stunden.

Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 45 min bei 16.000g und 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser für 10 min bei 60°C gelöst.

### 3.4.3 Bestimmen der RNA-Konzentration und Reinheit

Durch photometrische und elektrophoretische Bestimmung konnte die Konzentration und die Reinheit (Degradierungsgrad) der isolierten RNA ermittelt werden.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine 250fache Verdünnung hergestellt und im Photometer bei 260nm die Extinktion gemessen. Der Reinheitsgrad wird durch das Verhältnis der Extinktionswerte bei 260 nm zu 280 nm angegeben und sollte bei 1,8 –2 liegen.

Für die elektrophoretische Auswertung wurden max. 5 $\mu$ l RNA-Probe mit 15 $\mu$ l RNA-Samplepuffer und 2 $\mu$ l 6x-Ladepuffer zunächst 10 min auf 65°C erwärmt und danach auf ein 1%iges TAE-Agarosegel auf getragen.

## 3.5 Isolierung der mRNA aus total RNA

Für die mRNA – Isolierung aus total RNA wurde das mTRAP-Total-Kit der Firma Active Motif verwendet.

Zu max. 200 $\mu$ g total RNA wurde das gleiche Volumen 2x-Bindepuffer und 15 $\mu$ l Poly T-PNA-Probe zugegeben. Nach Erhitzen für 5 min auf 70°C wurde der Ansatz bei 14.000g für 5 sec zentrifugiert und anschließend bei Raumtemperatur und Schütteln bei 300 rpm für 15 min inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 60 $\mu$ l Streptavidin-Beads hinzugefügt und 45 min bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Nach Zentrifugieren des Ansatzes für 5 min bei 14.000g und Entfernen des Überstandes wurden die Beads mit 750 $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und

zentrifugiert. Danach erfolgte eine DNase-Behandlung, wobei die Beads in 100µl Waschpuffer resuspendiert und mit 0,5µl DNase I (10u/µl) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dem Zentrifugieren wurden die Beads wie schon beschrieben zweimal gewaschen. Durch Resuspendieren der Beads in 75µl DEPC-Wasser bei 75°C für 2 min wurde die mRNA aus der Poly T-PNA-Probe eluiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und der Überstand mit der mRNA in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und zur Inaktivierung der DNase für 3 min bei 95°C erhitzt.

Die Aufreinigung der mRNA erfolgte mit dem im Kit enthaltenen TouchDown-Reagenz, das in einem 5fachen Volumen zugegeben wurde. Der Ansatz wurde nach 10 sec Vortexen bei -20°C für 20 min gefällt, anschließend 20 min zentrifugiert bei 14.000g und 4°C. Danach wurde das Pellet mit 200µl absolutem Ethanol gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und schließlich getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 25 µl DEPC-Wasser bei 70°C für 10 min gelöst.

### 3.6 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit der M-MLV- oder ImPromII™- Reversen Transkriptase der Firma Promega.

Pro 25µl – Gesamtreaktionsansatz wurden zunächst bis zu max. 5µg total RNA oder 1µg mRNA mit 0,5µg Oligo-dT und 0,5 µg Random-Hexameren im 15µl-Volumen hybridisiert, wozu dieser Ansatz 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf 4°C gekühlt wurde. Danach erfolgte die Zugabe der weiteren Komponenten : 5µl 5x- RT-Puffer, 500 µM dNTPs, 40u rRNasin, und 200u Reverse Transkriptase. Die Umschreibreaktion in first-strand-cDNA wurde bei 42°C für 1 Stunde durchgeführt. Nach Inaktivieren des Enzyms bei 70°C für 10 min wurde die RNA durch Hinzufügen von 2µl 2,5M NaOH bei 37°C für 15 min degradiert. Nach einer anschließenden Neutralisation der Reaktion mit 10µl 2M HEPES erfolgte eine Aufreinigung der cDNA über Amicon® Microcon®-PCR- Aufreinigungssäulen (Fa. Millipore).

### 3.7 RT –PCR

#### 3.7.1 Two Step - RT – PCR

Für die Two Step-RT-PCR wird schon synthetisierte cDNA (siehe 3.6) als Matrize eingesetzt. Eine RT-PCR-Reaktion enthielt 1x-PCR-Puffer, 1,5-3 mM MgCl<sub>2</sub> für Reaktionen im Reaktionsgefäß (Flüssigphasenreaktion) oder bis zu 6 mM MgCl<sub>2</sub> für Reaktionen auf der Oberfläche, 200 µM dNTPs, je 400 mM forward- und revers- Primer, 20 – 40 ng cDNA-

Matrize (entspricht 1:10 bis 1:20-Verdünnung aus Reverse Transkription-Reaktion) und 1 u DNA-Taq-Polymerase.

### 3.7.2 One Step - RT – PCR

Bei der One Step-RT-PCR wird RNA als Matrize verwendet.

#### 3.7.2.1 Zwei-Enzym-Reaktion

Pro Reaktion wurden 1x-RT-Puffer (oder RNase-freier PCR-Puffer), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 μM dNTPs, 0,5μg Oligo-dT, 0,5μg Random-Hexamere, jeweils 400 mM forward- und revers-Primer, 40u rRNasin und max. 500ng RNA für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe von 1μl Reverser Transkriptase (ImPromII™) und 0,5μl DNA-Taq-Polymerase (50xTitanium- Taq (Fa. Clontech) oder Immolase (5u/μl; Fa. Bioline) wurde die Reaktion im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt : beginnend mit 25°C für 5 min, weiterführend bei 42°C für 1 Stunde für die Reverse Transkriptionsreaktion, sofort anschließend 95°C für 5 min zum Inaktivieren des RT-Enzyms und als initialen Denaturierungsschritt für die anschließende PCR-Amplifikation á 35 Zyklen mit Denaturieren bei 94°C für 1 min, Annealen bei 57°C für 1 min und Elongation bei 70°C für 1 min.

#### 3.7.2.2 Ein-Enzym-Reaktion

Bei der Ein-Enzym-Reaktion wird Tth-Polymerase verwendet, die je nach Vorhandensein von Mn<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>- Ionen als Reverse Transkriptase- oder als thermostabile DNA-abhängige Polymerase arbeiten kann, d.h. RNA in cDNA umschreibt oder die Polymerisation von Nukleotiden in dsDNA katalysiert.

Die Reaktion wurde mit 1x-RT-Puffer , 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 500 μM dNTPs, 0,5μg Oligo-dT, 0,5μg Random-Hexameren, jeweils 400 mM forward- und revers- Primer, 40u rRNasin und bis zu 1μg RNA für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe von 1μl Tth- DNA-Polymerase (5u/μl, Fa. Promega) wurde die Reaktion im Thermocycler unter folgenden Bedingungen gestartet : 1. 25°C für 5 min, 2. 60°C für 30 min zum Umschreiben der RNA in cDNA, danach sofortiges Erhitzen auf 95°C für 5 min und anschließendes PCR-Cycling mit 40 Zyklen Denaturieren bei 94°C für 1 min, Annealen bei 57°C für 1 min und Elongation bei 70°C für 1 min.

### 3.8 On-Chip-PCR

#### 3.8.1 On-Chip-PCR mit *M13*-DNA

Als Matrize wurde zirkuläre DNA des *M13*-Phagen (*M13mp18*) verwendet.

Für eine übliche On-Chip-PCR wurde eine 30-50 mM forward-M13-Primer-Lösung auf die Chipoberfläche im Arrayformat gespottet.

Die PCR wurde in einem 25µl-PCR-Rahmen (Eppendorf) mit folgenden Komponenten durchgeführt : 1x PCR-Puffer; 1,5 - 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM dNTP; 400 nM revers-M13-Primer; 25ng *M13mp18*; 0,5µl 50x Titanium™ *Taq* DNA Polymerase (Fa. Clontech) oder Elongase® Enzyme Mix (Fa. Invitrogen). Das Thermozyklusprogramm erfolgte im PTC 200 Tower (MJ Research) mit 35 Zyklen je 1min Denaturierung bei 95°C , 45 sec Annealing bei 64°C und 2 min Elongation bei 68°C. Bei Verwendung anderer Polymerasen (Tab.3) wurden max. 2,5u Enzym sowie die jeweilige Synthesetemperatur eingesetzt. Bei Verwendung von Immolase™ DNA Polymerase (Bioline) wurde dem ersten Zyklus ein Hitzeaktivierungsschritt für 7 min bei 95°C vorangesetzt.

**Tab. 3 Übersicht über verwendete PCR-Polymerasen**

PCR-Polymerase (Hersteller)	Besonderheit	Synthesetemperatur
<b>BIOTAQ™</b> DNA Polymerase (BIOLINE, Luckenwalde, Deutschland)	synthetisiert A-Überhang am PCR-Produktende	70-72°C
<b>CombiZyme</b> DNA Polymerase Mix (Invitek, Berlin, Deutschland)	Enzymmix ( <i>Taq</i> + <i>Tth</i> inorganic phosphatase)	70-72°C
<b>Elongase®</b> Enzyme Mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	Enzymmix ( <i>Taq</i> + <i>Pyrococcus</i> species)	68°C
<b>IMMOLASE™</b> DNA Polymerase (BIOLINE, Luckenwalde, Deutschland)	Hitze-Aktivierung (7min bei 95°C)	70-72°C
<b>Titanium™</b> <i>Taq</i> DNA Polymerase (Clontech, Heidelberg, Deutschland)	Hitze-Aktivierung durch Antikörper-Inhibition	68°C
<b><i>Taq</i> DNA Polymerase recombinant LC</b> (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland)	einfache <i>Taq</i>	70-74°C

### 3.8.2 On-Chip-PCR mit cDNA

Als Matrize wurde cDNA verwendet, die aus isolierter RNA umgeschrieben wurde (siehe 3.4 und 3.6). In den Standardexperimenten wurde eine cDNA-Verdünnung von 1:20 eingesetzt. (Startmaterial war 1-2µg RNA umgeschrieben in cDNA und mit anschließendem DNase-Verdau und Aufreinigung im 25µl-Volumen.)

Auf der Chipoberfläche wurden jeweils 30-50 µM forward-Primer im Arrayformat gespottet.

Die PCR wurde mit 1x PCR-Puffer; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM dNTP; 400-800 nM revers-Primer und 80-800 nM forward-Primer. Als PCR-Polymerase wurden die in Tab.3 aufgeführten Enzyme getestet. Gute Ergebnisse wurden mit der Immobilase- und Titanium *Taq* DNA Polymerase erzielt (siehe Kapitel 4.2.4.2 Optimierung der On-Chip-PCR). Das Thermozyklusprogramm lief ab im PTC 200 Tower (MJ Research) mit 35 Zyklen je 45sec Denaturierung bei 95°C , 30 sec Annealing bei 55-58°C und 2 min Elongation bei 68-70°C. Abschließend kam ein 3-minütiger abschließender Syntheseschritt bei 68-70°C hinzu. Bei den meisten On-Chip-PCRs wurde noch ein Denaturierungs- und Annealingszyklus (95°C / 30 sec , 55-58°C / 30 min) unmittelbar nach den PCR-Zyklen angeschlossen.

### 3.8.3 On-Chip - One Step –RT PCR

Auf der Chipoberfläche wurden jeweils 30-50 µM forward-Primer im Arrayformat gespottet.

Pro Reaktion wurden 1x-RT-Puffer (oder RNase-freier PCR-Puffer), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM dNTPs, 0,5µg Oligo-dT, 0,5µg Random-Hexamere, (80 nM forward- Primer) und 800 nM revers- Primer, 40u rRNasin, max. 500ng RNA für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe von 1µl Reverser Transkriptase (ImPromII™) und 0,5µl DNA-Taq-Polymerase (50xTitanium- Taq (Fa. Clontech) oder Immobilase (5u/µl; Fa. Bionline)) wurde die Reaktionslösung auf das Array in einen PCR-Rahmen pipettiert. Im Thermocycler MJ Research TwinTower wurde die Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt : 1. 25°C für 5 min, 2. 42°C für 1 Stunde für Reverse Transkriptionsreaktion, sofort anschließend 95°C für 5-7 min zum Inaktivieren des RT-Enzyms und evtl. gleichzeitigen Aktivieren der Polymerase (Immobilase) für die folgende PCR-Amplifikation á 35 Zyklen mit Denaturieren bei 94°C für 1 min, Annealen bei 57°C für 30 sec und Elongation bei 70°C für 2 min. Ein abschließender Synthesezyklus wurde für 3 min bei 70°C durchgeführt und abschließend ein Denaturierungs- und Annealingzyklus mit 95°C für 30 sec und 57°C für 30 min.



### 3.9 Hybridisierung von PCR-Produkten auf der Chipoberfläche

Zum Test der Spezifität der immobilisierten Oligonukleotide sowie auch der PCR-Produkte wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt.

Die fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden entweder asymmetrisch generiert oder durch Lambda-Exonuklease-Verdau einzelsträngig gemacht.

#### 3.9.1 Asymmetrische PCR

Bei einer asymmetrischen PCR wird ein ungleichmäßiges Primerpaar-Verhältnis zugunsten eines einzelsträngigen PCR-Produktes eingesetzt. Die PCR wurde mit 1x PCR-Puffer; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM dNTP; 200 nM revers-Primer (fluoreszenz-markiert) und 20-80 nM forward-Primer; 10-25 ng Matrize und 1u *Taq* DNA Polymerase (Biotaq Red, Fa. Bioline bzw. *Taq* DNA Polymerase recombinant LC, Fa. MBI Fermentas) und bei folgendem Temperaturzyklusprogramm durchgeführt : 35 Zyklen je 30sec Denaturierung bei 95°C , 30 sec Annealing bei 58°C und 2 min Elongation 70°C.

#### 3.9.2 Lambda-Exonuklease – Verdau zur Generierung von Einzelsträngen

Die Lambda-Exonuklease baut innerhalb von DNA-Doppelsträngen in 5'-3'- Richtung selektiv 5'-phosphorylierte DNA-Stränge ab (Little et al. 1967).

Nach der PCR-Produkt-Aufreinigung aus einer 100µl-PCR-Reaktion wurde diese mit 1x Exonuklease-Puffer und 5u Lambda-Exonuklease bei 37°C für 30min inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 75°C inaktiviert. Die einzelsträngigen Produkte wurden gereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### 3.9.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden nach leicht geänderter Anleitung des jeweiligen Herstellers mit einem Kit (Invisorb Spin PCRapid Kit, Fa. Invitex Berlin) gereinigt : in eine Säule wurden 100-200µl PCR-Produkt mit 300µl Puffer P für 1 min inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Das Eluat wurde nochmals in die Säule gegeben, dort inkubiert und wieder zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 700µl Waschpuffer versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde die Säule auf ein neues steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß gesteckt, mit 20µl Elutionspuffer für 2min inkubiert und abschließend für 2 min zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Zur Konzentrierung der Probe wurde sie im Lyophilisator auf ein geeignetes Volumen eingengt.

### **3.9.4 Hybridisierung von einzelsträngigen PCR-Produkten**

Für eine Hybridisierung wurden 100ng einzelsträngige PCR-Produkte im 10µl-Volumen in einer Hybridisierungslösung aus 3x SSC, 20mM HEPES, 0.2% SDS auf das Array gegeben und mit einem Deckgläschen abgeschlossen. Die Hybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungskammer bei 65°C für 6h und anschließendem Abkühlen auf 25°C für 1h.

Die Chips wurden nach der Hybridisierung erst 10 min in 6x SSC, 0.01% SDS-Lösung , danach in 0.05x SSC- Lösung gewaschen und abschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 500 rpm wurden die Chips getrocknet und anschließend am Fluoreszenz-Scanner gescannt.

### 3.10 Materialien

#### 3.10.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme

**Tab. 4 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer und Enzyme mit Angabe der Bezugsquelle**

<b>Chemikalie, Lösung, Puffer, Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
<b><u>allgemein</u></b>	
DEPC-Wasser	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (absolut, 100%)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
EDTA (Ethyldinitrotetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris-Base)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
<b><u>Für RNA-Isolierung</u></b>	
TRI-Reagent <sup>®</sup>	Molecular Research Center, Inc. (USA)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Isopropanol (> 98%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
mTRAP-Total-Kit	Active Motif (Rixensart, Belgien)
DNase I	Stratagene (Deutschland)
<b><u>Für Reverse Transkription</u></b>	
5x- RT-Puffer	Promega (Mannheim, Deutschland)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (25mM)	Bioline (Luckenwalde, Deutschland) und Larova (Teltow, Deutschland)
Oligo-dT	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Random-Hexamere	Promega (Mannheim, Deutschland)

rRNasin	Promega (Mannheim, Deutschland)
M-MLV- oder ImPromII™- Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim, Deutschland)

---

### **Für PCR**

10x PCR-Puffer	MBI Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland) bzw. von den entsprechenden PCR- Polymerase-Anbietern
10x NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
50 mM MgCl <sub>2</sub>	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
dNTP-Mix (25 mM each)	Bioline (Luckenwalde, Deutschland) und Larova (Teltow, Deutschland)
BIOTAQ™ DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
CombiZyme DNA Polymerase Mix	Invitex (Berlin, Deutschland)
Elongase® Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
IMMOLASE™ DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
Titanium™ Taq DNA Polymerase	Clontech (Heidelberg, Deutschland)
Taq DNA Polymerase recombinant LC	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>M13mp18</i> –Bakteriophagen-Plasmid-DNA	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)

---

### **Für One-Step-RT-PCR (Ein-Enzym-System)**

10x Puffer	Promega (Mannheim, Deutschland)
10 mM MnCl <sub>2</sub>	Promega (Mannheim, Deutschland)
50 mM MgCl <sub>2</sub>	Promega (Mannheim, Deutschland)
dNTP-Mix (25 mM each)	Bioline (Luckenwalde, Deutschland) oder Larova
Tth-Polymerase	Promega (Mannheim, Deutschland)

---

### **Für Einzelstrang-PCR-Produkte**

10xLambda-Exonuklease-Puffer	NEB (Frankfurt/M, Deutschland)
Lambda-Exonuklease	NEB (Frankfurt/M, Deutschland)

**Für Agarosegel-Elektrophorese**

Agarose (low EEO)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland)
6xLadepuffer (Loading Dye Solution)	Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland)
Ethidiumbromid (powder grade for molecular biology)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
MOPS	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland)

RNA-Samplepuffer : 5 ml Formamid + 1,75 ml 37% Formaldehyd + 10x MOPS - Elektrophoresepuffer

10x MOPS-Elektrophoresepuffer : 0,2 M MOPS, pH 7; 50 mM NaAc; 5 mM EDTA

50x TAE-Puffer : 2 M Tris-Base ; 2 M Essigsäure ; 50 mM EDTA, wäßrig

**DNA-Marker**

Hyperladder I	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
Hyperladder IV	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
$\lambda$ / EcoRI+HindIII	Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland)

**Für Aufreinigung von PCR-Produkten und cDNA**

Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitek (Berlin, Deutschland)
Amicon® Microcon®-PCR- Aufreinigungssäulen	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA	
Elutionpuffer : 10 mM Tris-HCl, pH 8,5	

**Für Oberflächenmodifizierung**

APTES (3-Aminopropyl-trietoxysilane)	Fluka (Selze, Deutschland)
Avidin (aus Hühnereiweiß)	Fluka (Selze, Deutschland)
NaOH (Natriumhydroxid-Plätzchen)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
NeutrAvidin	Perbio Science (Bonn, Deutschland)
Streptavidin (aus <i>Streptomyces avidinii</i> )	Fluka (Selze, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (30%, technisch)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

---

**Für Kopplung**

Isocyanatopropyltriethoxysilan	Fluka (Selze, Deutschland)
1-Methylimidazol (> 99%)	Fluka (Selze, Deutschland)
EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid)	Fluka (Selze, Deutschland)
Bernsteinsäureanhydrid (Succinic anhydrid)	Fluka (Selze, Deutschland)

---

**Für Oberflächenblocklösung**

1-methyl-2-pyrrolidinone	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Bernsteinsäureanhydrid (Succinic anhydrid)	Fluka (Selze, Deutschland)

---

**Für Hybridisierungs- und Waschlösung**

HEPES	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
20x SSC-Puffer : 300 mM Natriumcitrat; 3 m NaCl, wässrig, pH 7,4	

### 3.10.2 Zellen und Zellkultur

In dieser Arbeit wurden *L929*-Zellen und *C2C12*-Zellen verwendet.

Die *C2C12*-Zellen im differenzierten und undifferenzierten Zustand wurde freundlicherweise von Frau Morgenstern und Dr. Pilarcyk vom AMBT-Berlin (Fraunhofer IBMT) zur Verfügung gestellt.

**Tab. 5 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Besonderheit
<i>C2C12</i>	Myoblasten aus Mausmuskelzellen	Differenzieren nach 5-6 Tagen zu kontraktile Myotubes
<i>L929</i>	Maus - Fibroblasten	

**Tab. 6 Nährmedien und Zusatzstoffe für die verwendeten Zelllinien**

Medium, Puffer, Zusätze	Hersteller
RPMI-Medium (mit 20mM HEPES, ohne NaHCO <sub>3</sub> ; F 1235)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
DMEM mit HEPES (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; D 6171)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hank's Salzlösung (HBSS; L 2035)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
PBS-Lösung ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (L 1825)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
FCS (S 0115)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Gentamycin(-Sulfat) (10mg/ml; A 2712)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
L-Glutamin (200mM; K 0280)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%; L 2143)	Biochrom (Berlin, Deutschland)

### 3.10.3 Glasträger und kommerzielle Slides für Mikroarrays

**Tab. 7 Glasträger für Arrays**

Glasträger / Slide	Modifizierung	Hersteller
Objektträger	Mattrand, 90° geschliffen, 76x26 mm, Kalk-Natron-Glas	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Genetix-Slide	silanisiert	Genetix (München, Deutschland)
CreativeChip® -Oligo und -PCR Slide	Epoxy-Oberfläche	Eppendorf (Deutschland)

### 3.10.4 Oligonukleotide / Primer

Unmodifizierte Primer sowie Primer, die für die Kopplung auf der Oberfläche verwendet wurden, wurden mit den entsprechenden Modifizierungen von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert.

Primer für On-Chip-Reaktionen wurden mit den Fluoreszenz-Labeln Cy5 oder Cy3 von der Firma MWG Biotech (Deutschland) oder mit TRITC-Label von der Firma Biotex (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

#### Für PCR mit *M13*-DNA

Als Matrize wurde *M13mp18*-Plasmid-DNA verwendet.

**Tab. 8 Sequenzen der M13-Primer**

Primer	Sequenz (5' ® 3')	Annealingbereich in <i>M13mp18</i> -Sequenz
<b>M13-for</b>	TTT CGC GCT TGG TAT AAT CGC TGG	1173-1196 +/-
<b>M13-rev</b>	AAC GGA GAT TTG TAT CAT CGC CTG	1164-1141 +/-
<b>M13-rev500</b>	ACC AGA AGG AAA CCG AGG AAA CGC	2911-2888 +/-

Der forward-Primer wurde für die entsprechenden Kopplungsmethoden mit einer Modifizierung am 5'-Ende versehen : Biotin, C5-Aminolinker, Phosphorylierung.

**Tab. 9 M13-PCR-Produkte**

For-Primer	Rev-Primer	PCR-Produktgröße (bp)
M13-for	M13-rev	7242
M13-for	M13-rev500	1739



## Für PCR mit cDNA

Die Auswahl der Primersequenzen richtete sich nach den NCBI-Gendatenbanken (Tab.10).

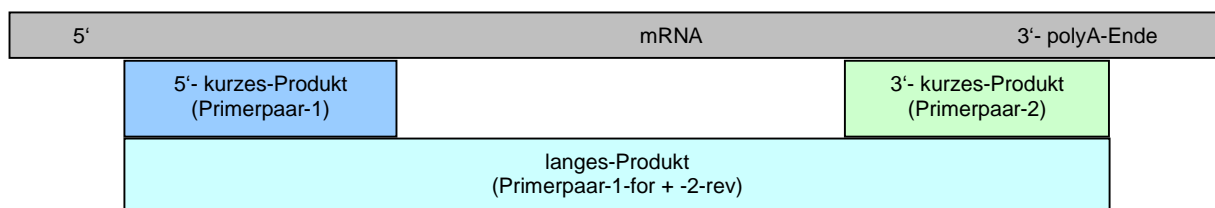
**Tab. 10 Sequenzdaten der mRNA-Sequenzen aus NCBI-Gendatenbank (Stand Oktober 2004)**

Gen	Acession-Nr.	Version-Nr.	Gengröße (gesamte bekannte mRNA-Sequenz)
<b>Chrna1</b>	NM_007389	GI:31542390	1374 bp (4290 bp)
<b>Chrna3</b>	NM_145129	GI:21553070	1515 bp (1783 bp)
<b>Chrb1</b>	NM_009601	GI:24475607	1506 bp (2186 bp)
<b>Chrnd</b>	NM_021600	GI:11034814	1563 bp (1961 bp)
<b>Chrne</b>	NM_009603	GI:6752949	1482 bp (1599 bp)
<b>Ckm</b>	NM_007710	GI:6671761	1146 bp (1415 bp)
<b>Myog</b>	NM_031189	GI:13654246	675 bp (1481 bp)
<b>Atp2a2</b>	NM_009722	GI:6806902	2997 bp (3984 bp)

Die forward-Primer (for) sind für die kovalente EDC-Kopplungsmethode am 5'-Ende phosphoryliert und enthalten dort zusätzlich einen Spacer aus 6-10 dT-Nukleotiden. Für die On-Chip-PCR wurden 5'-fluoreszenzmarkierte rev-Primer (Cy5-/ Cy3-/ TRITC-Markierung) eingesetzt.

Für die PCR wurden Primersequenzen nahe der 5'- Enden (Primerbezeichnung -1-for/rev) und 3'- Enden (Primerbezeichnung -2-for/rev) der jeweiligen Gene bzw. mRNA ausgewählt.

Schema der amplifizierten Sequenzbereiche :



**Abb. 3 PCR-Produktbereiche für die Amplifizierung von mRNA-Sequenzen**

**Tab. 11 Primersequenzen mit Angabe des Annealingbereiches in der mRNA-Sequenz\***

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' @ 3')</b>	<b>Annealingbereich in mRNA-Sequenz*</b>
<b>P-CKM-1-for</b>	CC CAC AAC AAG TTC AAG CTG AAC TAC AAG	89-117 +/+
<b>CKM-1-rev</b>	GGT GAC CAG CCT TCT TGA AGA TCT CCT C	329-303 +/-
<b>P-CKM-2-for</b>	AC GAC AAC AAA AGC TTC CTT GTG TGG GTG	731-759 +/+
<b>CKM-2-rev</b>	TTG AAG ACC GTG TAG GAC TCC TCA TCG	880-853 +/-
<b>P-Myog-1-for</b>	AG TTC GGT CCC AAC CCA GGA GAT CAT TTG	576-604 +/+
<b>Myog-1-rev</b>	CTG CTA CAG AAG TGA TGG CTT TTG ACA CC	788-760 +/-
<b>P-Myog-2-for</b>	AC CGT TTG AGA GAC ATG AGT GCC CTG ACC	1059-1088 +/+
<b>Myog-2-rev</b>	AAC AAA AGA AGT CAC CCC AAG AGC CCC C	1367-1340 +/-
<b>P-ChrnA1-1-for</b>	GT ACA TTG CAG AGA CCA TGA AGT CAG ACC	1220-1248 +/+
<b>ChrnA1-1-rev</b>	AGA CAG ACC TTC CTC TCT TCC ATC TTT CC	1471-1443 +/-
<b>P-ChrnA1-2-for</b>	GC CTT TGA ATC ACA AAC ACA TCT GAT CCG	3602-3630 +/+
<b>ChrnA1-2-rev</b>	ATA CAC CCC AAA ACC CAT TCT CCA CAT CC	3981-3953 +/-
<b>P-ChrnA3-1-for</b>	CG ATG TGA CCT ACT TCC CGT TTG ACT ACC	603-631 +/+
<b>ChrnA3-1-rev</b>	AAG GAG ATG AGC AGG CAC GGA ATG ATG AG	890-862 +/-
<b>P-ChrnA3-2-for</b>	AA GAC GCC CCA AAG ACG AGG AAC TTC TAC	1211-1239 +/+
<b>ChrnA3-2-rev</b>	CAG ACA GGG ACA ACA CAG CAT CAA CAG AC	1426-1389 +/-
<b>P-ChrnB1-1-for</b>	TC ACC TAC TTC CCC TTT GAC TGG CAG AAC	529-553 +/+
<b>ChrnB1-1-rev</b>	AAC TTC CTC ATG ATG CCC TTC CTT CCC AC	769-741 +/-
<b>P-ChrnB1-2-for</b>	AG AGA GAC CAA CTC CCT GAA CCA CAT CAC	1165-1189 +/+
<b>ChrnB1-2-rev</b>	ATG AAT GTC CAC AGA AAA AGA CGG TCC AC	1491-1463 +/-
<b>P-ChrnD-1-for</b>	CT AAG TCT CAC CCT CTC CAA CCT CAT CTC	229-257 +/+
<b>ChrnD-1-rev</b>	GCA CAT TGC AGG CAT AAG AAA TCT GGA AC	457-429 +/-
<b>P-ChrnD-2-for</b>	CA CCA ACC ACC AAG ATG TCA CCT TCT ACC	753-781 +/+
<b>ChrnD-2-rev</b>	TGG AGA TAA GCA GCA GGA AGA CAG ATT GGG	952-923 +/-
<b>P-ChrnE-1-for</b>	CA CCC TAA CCA ACC TCA TCT CAC TGA ACG	184-212 +/+
<b>ChrnE-1-rev</b>	AAC CAG CTC ACA TAG CCT CCC TCA TAG AC	435-407 +/-

<b>P-ChrnE-2-for</b>	AA GAT TGA CAT TGA CAC GGC AGC TTT TAC	590-618 +/+
<b>ChrnE-2-rev</b>	TGG CAA CCA CCA TGA CGA ATA TAA GAT AC	965-937 +/-
<b>P-Atpase-1-for</b>	CCT TCA GTC CTT TGA TGA GAT CAC AGC	2277-2303 +/+
<b>Atpase-2-for</b>	CGA GTT GAA CCT TCC CAC AAG TCT AAG	2239-2265 +/+
<b>Atpase-rev</b>	GAA ATG ACT CAG CTG GTA GAA GGA GAC	2826-2800 +/-

\* mRNA-Sequenz : Quelle siehe Tab.10

In Tab.12 sind die PCR-Produkte, die entsprechend der Primerkombinationen synthetisiert werden können, aufgelistet.

**Tab. 12 Übersicht der PCR-Produkte aus entsprechenden Primerkombinationen**

Abk. in PCR	For-Primer	Rev-Primer	PCR-Produktgröße (bp)
1	P-CKM-2-for	CKM-2-rev	150
2	P-CKM-1-for	CKM-1-rev	241
C	P-CKM-1-for	CKM-2-rev	792
3	P-Myog-2-for	Myog-2-rev	309
4	P-Myog-1-for	Myog-1-rev	213
M	P-Myog-1-for	Myog-2-rev	792
5	P-ChrnA1-2-for	ChrnA1-2-rev	380
6	P-ChrnA1-1-for	ChrnA1-1-rev	252
A1	P-ChrnA1-1-for	ChrnA1-2-rev	2762
7	P-ChrnA3-1-for	ChrnA3-1-rev	288
8	P-ChrnA3-2-for	ChrnA3-2-rev	216
A3	P-ChrnA3-1-for	ChrnA3-2-rev	824
9	P-ChrnB1-1-for	ChrnB1-1-rev	241
10	P-ChrnB1-2-for	ChrnB1-2-rev	327
B1	P-ChrnB1-1-for	ChrnB1-2-rev	963
11	P-ChrnD-1-for	ChrnD-1-rev	229
12	P-ChrnD-2-for	ChrnD-2-rev	200
D	P-ChrnD-1-for	ChrnD-2-rev	724

<b>Abk. in PCR</b>	<b>For-Primer</b>	<b>Rev-Primer</b>	<b>PCR-Produktgröße (bp)</b>
13	P-ChrnE-1-for	ChrnE-1-rev	252
14	P-ChrnE-2-for	ChrnE-2-rev	376
E	P-ChrnE-1-for	ChrnE-2-rev	782
15	P-Atpase-1-for	Atpase-rev	550
ATP	Atpase-2-for	Atpase-rev	588

## 4 Ergebnisse

### 4.1 On – Chip - PCR mit M13 –DNA

Zum Nachweis von Gensequenzen aus RNA wurde zuerst die Methode der On-Chip-PCR, d.h. der Synthese und Amplifikation von DNA-Sequenzen an Oberflächen-immobilisierten Oligonukleotiden (Primern) anhand der DNA-Sequenz des M13-Phagengenoms getestet. Diese DNA ist in der reinen Plasmidform (*M13mp18*) kommerziell erhältlich und die gesamte Sequenz (7250 bp) leicht mittels PCR amplifizierbar, sodass Verunreinigungen der DNA als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnten.

Durch PCR an immobilisierten Primern konnten Ausschnitte (1740 bp) aus dem Gesamtgenom sowie die gesamte Sequenz (7240 bp) auf der Oberfläche amplifiziert werden.

Als freier Primer in Lösung wurde nur der fluoreszenz-markierte Gegenstrang-Primer (M13-revers) eingesetzt.

Der immobilisierte Primer wurde mittels affiner Bindung oder kovalenter Bindung an die Oberfläche gekoppelt.

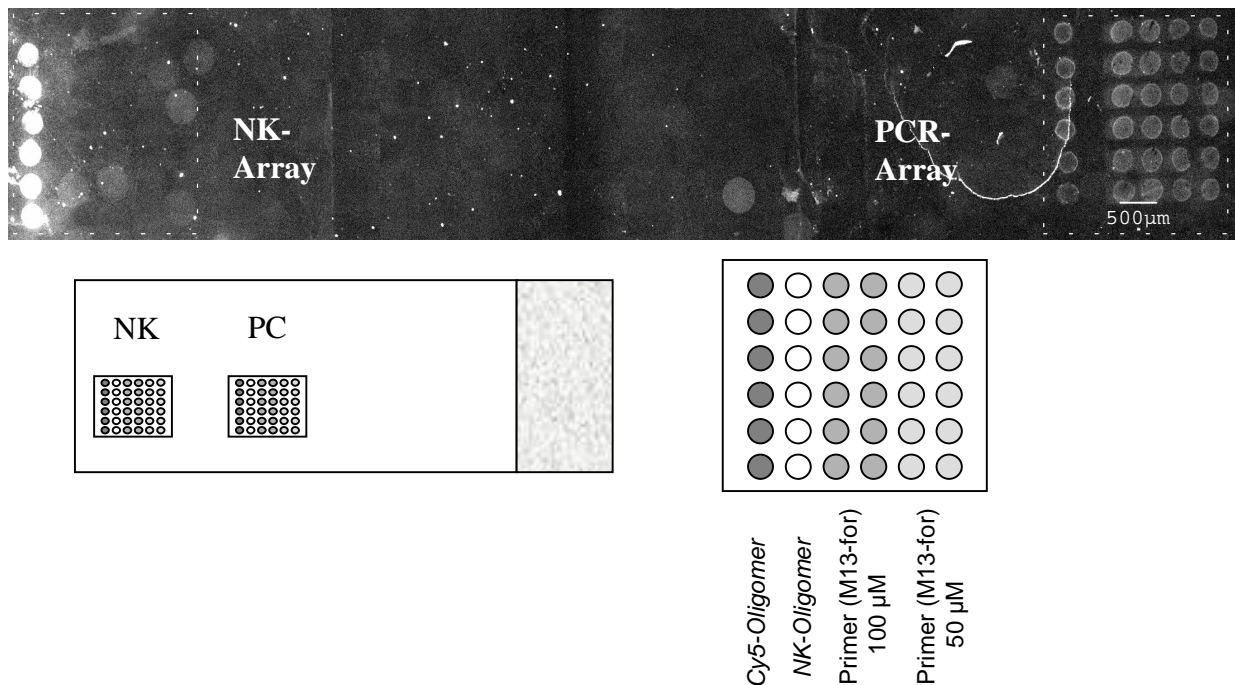
#### 4.1.1 On – Chip - PCR an affin gekoppelten Primern

Für eine On-Chip-PCR mit affin gekoppelten Primern wurden Oberflächen getestet, die mit Streptavidin, Neutravidin oder Avidin beschichtet wurden. Auf diese Oberflächen wurden 5'-biotinylierte Oligonukleotide gespottet und 24h in einer trockenen Kammer inkubiert. Die Primersequenz wurde in den Konzentrationen von 100 und 50µM gespottet. Als Negativ-Kontrolle wurde ein biotinyliertes Oligonukleotid (NK-Oligomer) immobilisiert, das keine Übereinstimmung oder Komplementarität mit der Sequenz des PCR-Produktes besitzt. Zusätzlich wurde noch eine Kontrollreihe mit einem bifunktionellen Oligonukleotid (Cy5-Oligomer), das am 5'-Ende biotinyliert und am 3'-Ende Cy5-gelabelt ist, gespottet. Die Sequenz dieses Oligonukleotids hat ebenfalls keine Sequenzähnlichkeiten mit dem PCR-Produkt und dient nur der Lokalisierung des Arrays beim Scannen.

Die Bildaufnahme erfolgte am ArrayWorx-Scanner (Applied Precision, USA) bei den entsprechenden Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluoreszenzmarkierungen (595 nm - Kanal für Cy3 und TRITC, 682 nm – Kanal für Cy5).

Für eine PCR-Reaktion an Oberflächen-immobilisierten Primern muss die Oberfläche hitzebeständig sein, um das sich wiederholende Denaturieren der Matrizenmoleküle zu gewährleisten. Diesen Anspruch konnte am besten die Streptavidin-beschichtete Oberfläche

erfüllen (Abb.4). Bei Avidin- und Neutravidinoberflächen konnten keine synthetisierten PCR-Produkte detektiert werden bzw. waren die Ergebnisse nicht jederzeit reproduzierbar.



**Abb. 4 On-Chip-PCR mittels Biotin-Streptavidin-Kopplung und Cy5-Primer**

**oben** ArrayWorx-Bild bei 682 nm

NK - Negativ-Kontroll-Array (Cycling mit H<sub>2</sub>O); PCR - Array mit PCR-Reaktion

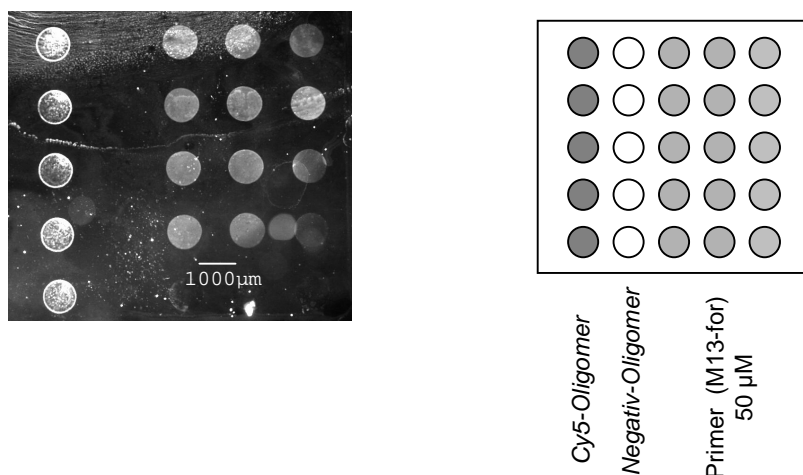
**unten links** Arrayanordnung auf Chip; **unten rechts** Arrayzusammensetzung

Die Oligonukleotide wurden mit dem Nanoplotter im Abstand von 500 µm auf die Chipoberfläche gespottet. Jedes Array wurde mit einem 25µl-PCR-Rahmen versiegelt und einem Temperaturzyklusprogramm unterzogen (siehe auch Methodenteil). *Cy5-Oligomer* – Cy5-Kontroll-Oligonukleotid ; *NK-Oligomer* – Negativ-Kontrolloligonukleotid

Der Chip von Abb.4 zeigt die erfolgreiche On-Chip-PCR (rechtes Array), die mit der Titanium™-Taq-DNA-Polymerase (Clontech) durchgeführt wurde. Da die Negativkontroll-Reihe kein Signal beim Scannen zeigt, können die PCR-Spots als Falschpositive ausgeschlossen werden. Auf das linke Array wurde nur Wasser im Cycling-Programm mitgeführt, um die Stabilität der Biotin-Streptavidin-Kopplung zu überprüfen.

Diese On-Chip-PCR wurde noch mit anderen Polymerasen, z.B. Elongase-Enzymmix (Invitrogen) und Taq-DNA-Polymerase LC (Fermentas) getestet. Das Ergebnis ergab, dass auch andere Polymerasen verwendet werden können. Jedoch waren bei der Verwendung von einfachen Taq-DNA-Polymerasen die Signale schwächer.

In Abb.5 ist das Ergebnis einer On – Chip – PCR mit dem Elongase-Enzymmix zu sehen.



**Abb. 5 On-Chip-PCR mit Streptavidin-Biotin-Kopplung und Elongase**

**links** ArrayWorxbild bei 682 nm ; **rechts** Arrayzusammensetzung

Die biotinylierten Primer (M13-for) wurden für diese PCR am Probot im Abstand von 1mm getropft. Als Gegenprimer wurde der Cy5-markierte M13-rev eingesetzt. Die Cy5-markierten PCR-Produkte auf der Oberfläche wurden bei 682 nm am ArrayWorx detektiert.

*Cy5-Oligomer* – Cy5-Kontroll-Oligonukleotid ; *NK-Oligomer* – Negativ-Kontrolloligonukleotid

#### 4.1.2 On – Chip - PCR an kovalent gekoppelten Primern

Für die Versuche mit kovalent gekoppelten Primern wurden neben der EDC-Methode mit phosphorylierten Primern auch aminierte und „silanisierende“ Primer auf geeigneten entsprechenden Oberflächen für die Verwendbarkeit der On-Chip-PCR getestet.

##### 4.1.2.1 Chip-PCR mit kovalent gebundenen silanisierenden Primern

Die Methode der Kopplung über silanisierende Primer erfolgte in abgewandelter Form nach dem Protokoll von Kumar et al. (2000). Hierzu werden 5'-amino-modifizierte Primer auf einer silanisierten oder NaOH-aktivierten Oberfläche immobilisiert. Die Primer selbst werden mit einem Isocyano-Silan in Verbindung gebracht, sodass diese nach dem Spotten schon im Tropfen auf der Oberfläche silanisieren. Zum Spotten ist die silanisierte Oberfläche besser geeignet, da diese hydrophober als die NaOH-aktivierte Oberfläche ist. Prinzipiell funktioniert aber auch die NaOH-Oberfläche.

Die Chips wurden nach dem Tropfen mit dem Probot (6x6 Array mit einem Tropfenabstand von 1mm und einem Tropfvolumen von 10-30 nl) 48 h in einer feuchten Kammer zum

Immobilisieren gelagert. Nach dem Immobilisieren wurden die Chips erst mit TE-Puffer gespült und dann zur PCR verwendet.

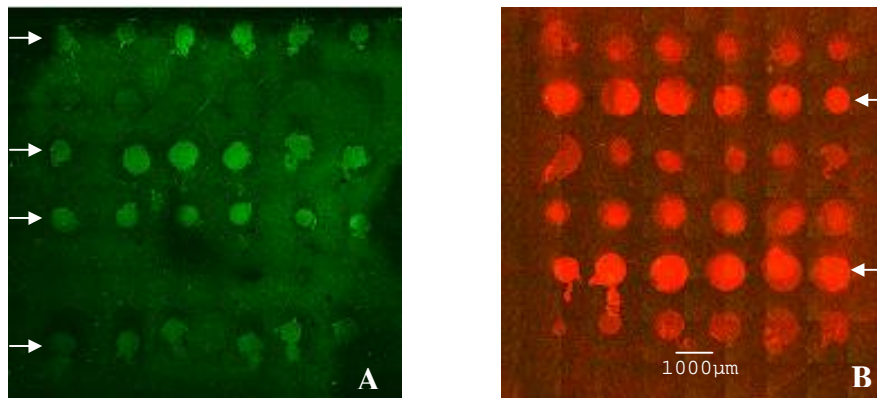
Die Ergebnisse aus Vorversuchen zeigten, dass diese Immobilisierungsmethode den PCR-Bedingungen standhält und konnte daraufhin für On-Chip-PCR-Experimente eingesetzt werden.

Zur PCR-Reaktionslösung wurden unmodifizierte M13\_revers-Primer als freie Primer beigefügt.

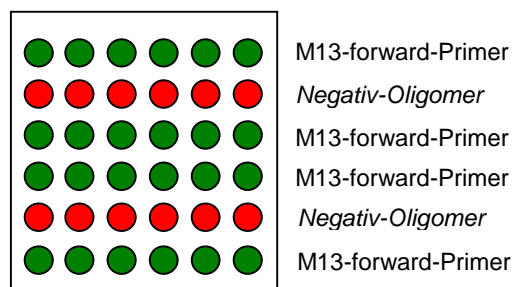
Nach der PCR wurden die Chips mit TE-Puffer und destilliertem Wasser gespült. Die PCR-Produkte auf der Oberfläche konnten nun mit der geeigneten Detektionsmethode sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde das Array mit einem DNA-Farbstoff gefärbt. Für diese indirekte Nachweismethode wurden die DNA-Farbstoffe PicoGreen, SybrGreenI und Yoyo1 verwendet. Alle Farbstoffe wurden genau entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und eingesetzt. Die Anfärbungen mit PicoGreen und SybrGreen erbrachten jedoch keine zufrieden stellende Resultate, da neben den doppelsträngigen DNA-Molekülen auch einzelsträngige Oligonukleotide in kaum zu unterscheidender Intensität gefärbt wurden. Somit war die Wahrscheinlichkeit von falschpositiven Signalen sehr hoch und diese DNA-Farbstoffe wurden für eine eindeutige Resultataussage in weiteren Experimenten als ungeeignet ausgeschlossen. Dagegen konnte in Vorversuchen mit Yoyo1 beobachtet werden, dass dieser Farbstoff doppelsträngige DNA-Moleküle bevorzugt anfärbt, Einzelstränge dagegen nur sehr schwach. Die Auswertung erfolgte am Laserscanmikroskop (LSM). In Abb.6A ist deutlich zu erkennen, dass nur die M13-PCR-Tropfen gefärbt wurden und nicht das einzelsträngige Negativ-Oligomer. Anschließend wurde eine zum Negativ-Oligomer komplementäre TRITC-modifizierte Oligonukleotid-Probe auf den Chip gegeben und 15 min hybridisiert. Nach Spülen in TE-Puffer und destilliertem Wasser wurde der Chip ein weiteres Mal am LSM ausgewertet. Neben den schon angefärbten PCR-Produkten ist nun auch das Negativ-Oligomer sichtbar (Abb.6B).





Spotting-Muster (Probot) :



#### Abb. 6 LSM-Bild der On-Chip-PCR mit silansierenden Primern

**A** Anfärbung der PCR-Produkte mit Yoyo1: Die grün gefärbten Spots des LSM-Aufnahme (Pfeile) stellen die mit Yoyo1-gefärbten On-Chip-PCR-Produkte dar. Immobilisiert wurden M13-forward-Primer, die während der PCR mit Hilfe von M13-DNA als Matrize verlängert wurden.

**B** Wiederholung des Experiments A mit zusätzlicher Hybridisierung eines TRITC-markierten Oligonukleotids an das immobilisierte komplementäre Negativ-Oligomer (Pfeile). Das Bild zeigt die LSM-Aufnahme des Simultanscans für Yoyo1 und den TRITC-Farbstoff.

Beide Aufnahmen sind in Falschfarben zur besseren Verdeutlichung dargestellt.

Als weitere Überprüfung wurde an dem immobilisierten und amplifizierten M13\_forward-Strang eine FAM-markierte Sonde hybridisiert. Die zur Sonde komplementäre Sequenz befindet sich am Ende des synthetisierten PCR-Produktes und ist nicht komplementär zur immobilisierten Primersequenz, damit ein falschpositives Ergebnis durch Hybridisierung am gekoppelten Primer ausgeschlossen werden konnte. Dazu wurde der Chip 10 min in 90°C-warmes Wasser getaucht, um die Doppelstränge aufzuschmelzen bzw. den nicht immobilisierten revers-Strang abzuschmelzen. Anschließend wurde die Sonde an den M13\_forward-Strang hybridisiert, wodurch die dementsprechenden Spots im LSM sichtbar waren (Abbildung hier nicht gezeigt).

#### 4.1.2.2 On-Chip-PCR auf Epoxy-Oberflächen

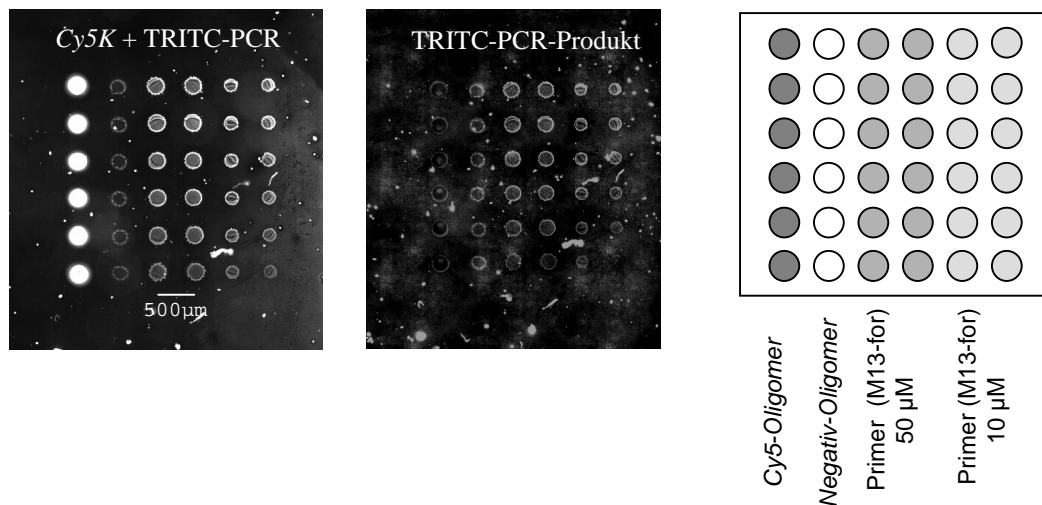
Epoxy-Oberflächen eignen sich besonders für die Kopplung von amino-modifizierten Molekülen. Bei anderer Behandlung der Chips nach dem Spotten (Backen bei 120°C / 30min) können auch unmodifizierte Oligonukleotide oder PCR-Produkte immobilisiert werden.

Die Firma Eppendorf bot bis 2002 Epoxy-beschichtete Chips als Eppendorf Creative Chips® in Form von „Oligo-Slides“ sowie auch „PCR-Slides“ zum Spotten von Oligonukleotiden bzw. PCR-Produkten an. Der Unterschied zwischen diesen beiden Chip-Typen besteht in der räumlichen Struktur der Epoxybeschichtung, die bei den „Oligo-Slides“ dreidimensional und bei den „PCR-Slides“ zweidimensional ist.

Im hier gezeigten Versuch wurden 5'-amino-modifizierte Primer (M13\_forward) auf die Epoxy-Oberfläche gekoppelt.

In der On-Chip-PCR wurden 5'- Cy5- oder TRITC- gelabelte M13\_revers-Primer eingesetzt und die Synthese mit dem Elongase-Enzymmix durchgeführt.

In Abb.7 ist das Ergebnis der ArrayWorx-Auswertung mit TRITC-PCR-Produkten zu sehen.



**Abb. 7 On-Chip-PCR auf Epoxy-Oberflächen**

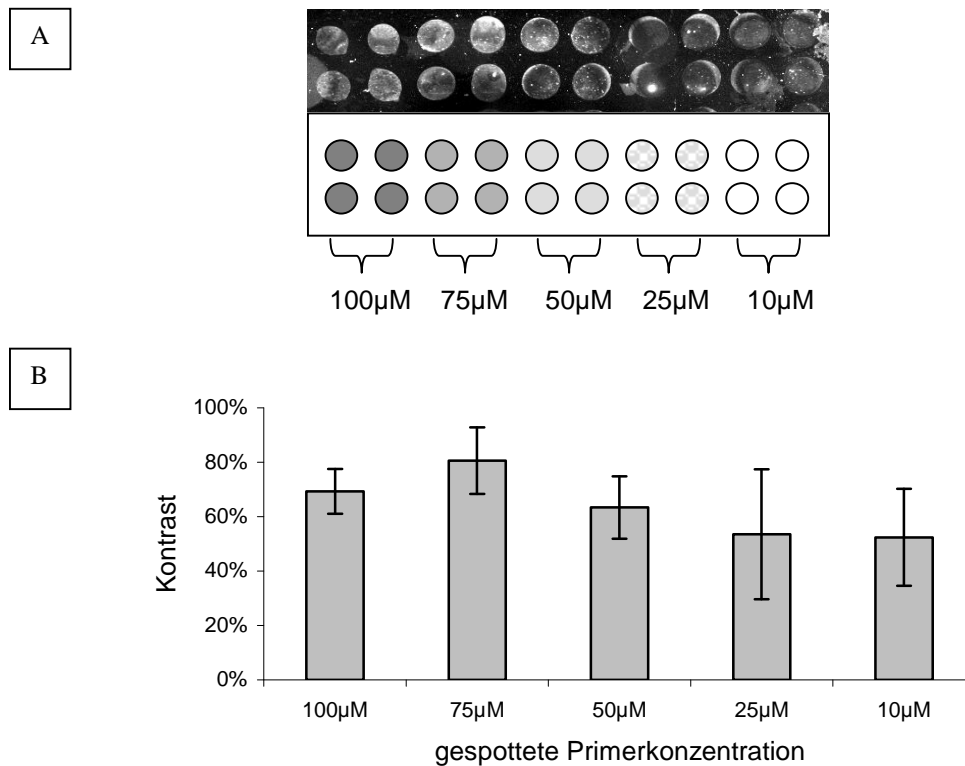
Die Detektion erfolgte am ArrayWorx-Scanner bei 595 nm für die TRITC-PCR-Produkte bzw. zusätzlich bei 682 nm für das Cy5-Kontroll-Oligomer. **links** Simultanscan bei 595nm und 682nm; **mitte** PCR-Array mit TRITC-PCR-Produkten, gescannt bei 595nm; **rechts** Arrayschema (gespottet am Nanoplotter) auf Eppendorf Creative Chips®

*Cy5-Oligomer(Cy5K)* – Cy5-Kontroll-Oligonukleotid ; *NK-Oligomer* – Negativ-Kontrolloligonukleotid

### 4.1.3 Konzentrationsgrenze des gespotteten Primers

Für diese Versuche wurden Primer in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  über zwei verschiedene Kopplungsmethoden - EDC-Kopplung auf silanisierter Oberfläche und 5'-aminierte Primer auf Epoxy-Oberfläche - immobilisiert.

In Abb.8 ist das Ergebnis der On-Chip-PCR an EDC-gekoppelten Primern zu sehen. Die phosphorylierten Primer wurden dazu in den Konzentrationen von 10 bis 100  $\mu\text{M}$  gespottet. Für alle Konzentrationen waren PCR-Produkte nachzuweisen. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten ergibt eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensitäten sowie der Kontrastwerte. Bei der geringsten Primerkonzentration von 10 $\mu\text{M}$  liegt der Kontrastwert noch über 50% und die entsprechenden Spots sind somit im eindeutig detektierbaren Bereich.



#### Abb. 8 On-Chip-PCR an EDC-gekoppelten Primern unterschiedlicher Spottingkonzentrationen

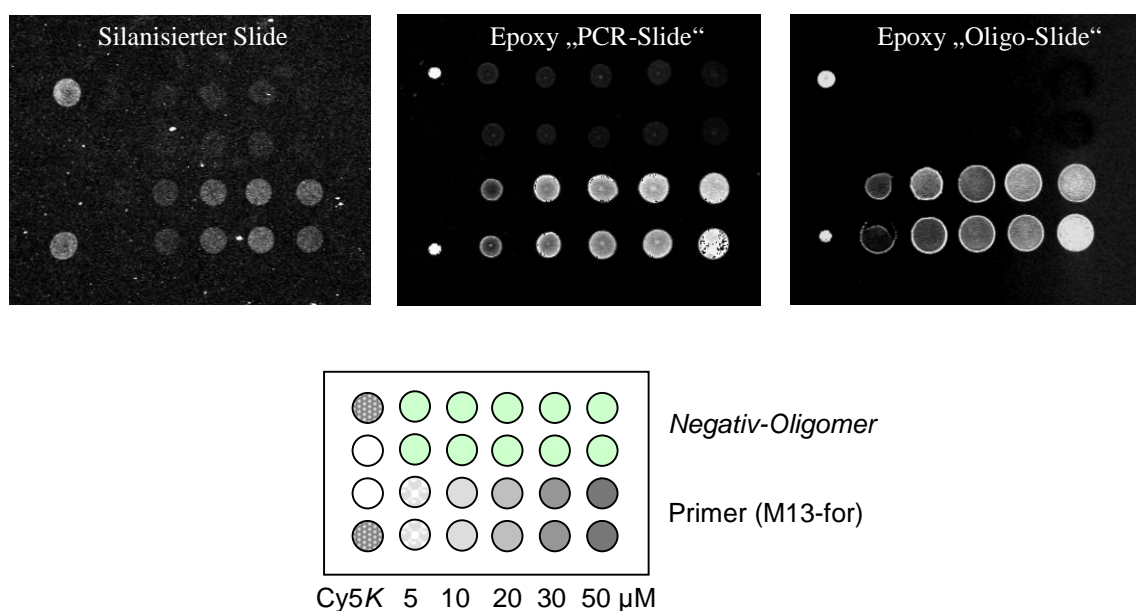
Auf einer silanisierten Glasoberfläche wurden 5'-phosphorylierte Primer (M13-for) in einer Konzentrationsreihe von 100 bis 10  $\mu\text{M}$  gespottet und kovalent über die EDC-Methode gekoppelt. Die On-Chip-PCR erfolgte mit M13-DNA als Matrize und einem Cy5-Gegenstrangprimer (M13-rev). Die Fluoreszenzdaten wurden über die ImaGene™-Software ausgewertet. Pro Primerkonzentration wurden 10 Spots ausgewertet.

**A** Scanbild (ArrayWorx) bei 682 nm

**B** Auswertung der Kontrastwerte

Der Vergleich der zwei verschiedenen Kopplungsmethoden (EDC-Kopplung und Kopplung aminierter Primer auf Epoxy-Oberflächen) ist in Abb.9 präsentiert. Wie dieses Ergebnis zeigt, können unabhängig von der Kopplungsmethode Amplifikationsprodukte bis 10  $\mu\text{M}$  gespottetem Primer detektiert werden. Unter 10  $\mu\text{M}$  liegt die Detektionsgrenze.

Eine Primerkonzentration von 30-50  $\mu\text{M}$  ist ausreichend für ein eindeutig detektierbares Ergebnis und wurde deshalb in allen weiteren Versuchen verwendet.

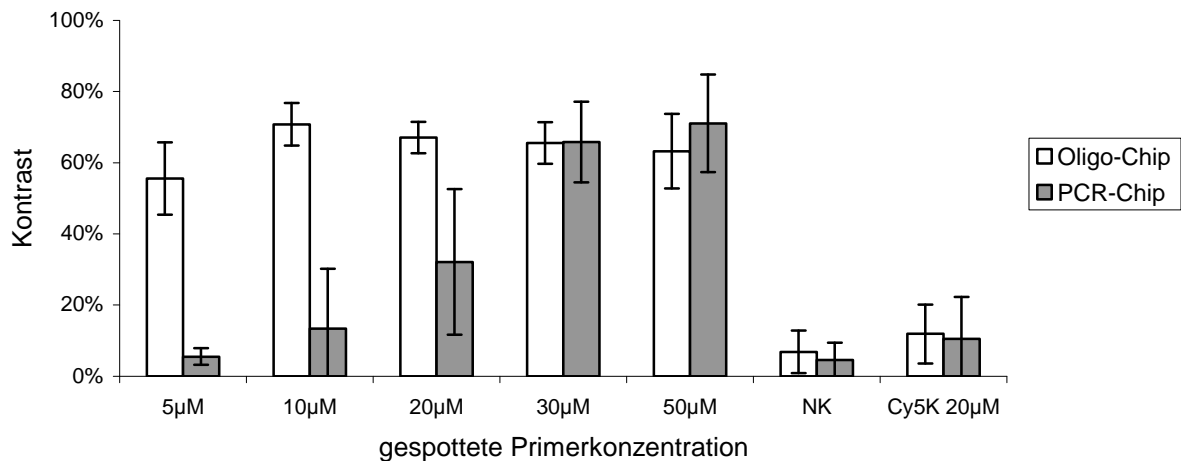


**Abb. 9 Vergleich der EDC-Kopplung mit Kopplung auf Epoxy-Oberflächen anhand der On-Chip-PCR an unterschiedlich konzentrierten gekoppelten Primern**

Die Immobilisierung der 5-50  $\mu\text{M}$  gespotteten Primer erfolgte über EDC-Kopplung auf einer silanisierten Glasoberfläche (linkes Bild) oder über Bindung von aminierten Primern auf Epoxy-beschichteten Glasoberflächen (mittleres und rechtes Bild: Eppendorf Creative PCR Slide® bzw. Eppendorf Creative Oligo Slide). Zusätzlich zu den PCR-Primern wurden Negativ-Kontroll-Oligonukleotide ebenfalls in 5-50 $\mu\text{M}$  Konzentrationsreihe sowie eine Cy5-gelabelte Immobilisierungskontrolle (Cy5K) gespottet. Das Spotten erfolgte am TopSpot.

Bei beiden Kopplungsmethoden liegt die Detektionsgrenze bei 10 $\mu\text{M}$  gespotteter Primerkonzentration.

In Abb.10 sind die Kontrastwerte für die zwei verschiedenen Epoxy-Oberflächen im Vergleich dargestellt. Mit höherer gespotteter Primerkonzentration steigen die Werte bei der zweidimensionalen Oberfläche („PCR-Chip“), während bei der dreidimensionalen Oberfläche („Oligo-Chip“) die Werte gleich bleiben.



**Abb. 10 Vergleich der Kontrastwerte für die On-Chip-PCR auf Epoxy-Oberflächen mit gekoppelten Primern unterschiedlicher Spottingkonzentrationen**

Auf einer Epoxy-Oberfläche mit zwei („PCR-Chip“)- und dreidimensionaler („Oligo-Chip“)- Beschichtung wurden 5'-aminierte Primer (M13-for) in einer Konzentrationsreihe von 5 bis 50µM gespottet (siehe Abb.9). Die On-Chip-PCR erfolgte mit M13-DNA als Matrize und einem Cy5-Gegenstrangprimer (M13-rev). Die Fluoreszenzdaten wurden über die ImaGene™-Software ausgewertet. Pro Primerkonzentration wurden 8 Spots ausgewertet.

#### 4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der On-Chip-PCR mit M13-DNA

Bei der On-Chip-PCR mit M13-DNA als Matrize konnten PCR-Produkte von 1740 bp und 7250 bp, was dem gesamten M13-Phagengenom entspricht, an immobilisierten Primern generiert werden. Somit ist es möglich, DNA-Sequenzen verschiedener Größen an immobilisierten Primern zu amplifizieren. Ein weiteres Ergebnis aus unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass eine Amplifizierung bis zu 16,5 kb möglich ist (Nickisch-Rosenegk, Marschan et al. 2005).

Dabei können unterschiedliche Polymerasen sowie unterschiedliche Chipoberflächen mit dementsprechenden Kopplungsmethoden verwendet werden.

Eine ausreichende Primerkonzentration zum Immobilisieren für nachfolgende Festphasen-PCR ist ab 10  $\mu\text{M}$  gegeben. Eine optimale Konzentration unter Berücksichtigung von möglichen verminderten Kopplungsreaktionen liegt im Bereich von 30 –50  $\mu\text{M}$ .

Zur Detektion der PCR-Produkte wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Erstens das Anfärben der Spots mit DNA-Farbstoffen wie PicoGreen, SybrGreen I oder Yoyo1. Bis auf Yoyo1 konnten die PCR-Spots jedoch nicht im reproduzierbaren Maß eindeutig identifiziert werden. Deshalb wurde in weiteren Versuchen die zweite Methode des spezifischen Nachweises der PCR-Produkte auf der Oberfläche durch Verwenden von fluoreszenz-markierten Primern bevorzugt. Die PCR-Synthese mit gelabelten Primern erlaubt eine einfache und spezifische Detektion. Dabei konnte gezeigt werden, dass Cy5-, Cy3- und TRITC-Farbstoff-Label anwendbar sind.

## 4.2 On – Chip – PCR mit cDNA

Das Vorhandensein von bestimmten Genen in Zellen wird üblicherweise über den Nachweis der entsprechenden mRNA mittels Northern Blots oder auch in zunehmenden Maße über Mikroarrays (cDNA- oder Oligonukleotidarrays) bestimmt. Nachteil dieser Methoden ist, dass eine große Menge an Ausgangsmaterial, der RNA, bereitstehen oder diese erst in mehreren Schritten vermehrt werden muss (Wendisch et al. 2001, Dudley et al. 2002, Klur et al. 2003). In dieser Arbeit sollte versucht werden, ob diese Fragestellung auch mit anderen bzw. abgewandelten Methoden gelöst werden kann.

Eine Möglichkeit dazu bietet die On-Chip-PCR, bei der verschiedene Gensequenzen aus cDNA nachgewiesen werden sollten.

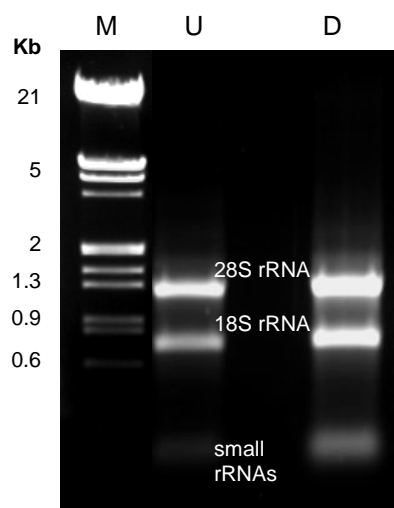
Im nachfolgenden sind die Ergebnisse von der RNA-Isolierung aus Zellen bis zur Detektion der Gensequenzen auf einer Oberfläche mittels On-Chip-PCR dargestellt.

### 4.2.1 Überprüfen der RNA- Isolierung im Agarosegel

Nach der RNA-Isolierung aus Zellen wurde diese photometrisch und elektrophoretisch auf ihre Reinheit und Degradierung überprüft.

Im Photometer kann neben der Konzentrationsbestimmung bei 260 nm auch die Reinheit über den Quotienten der Messung bei 260nm / 280nm bestimmt werden. Alle isolierten RNAs wiesen einen Wert von 1,8-1,9 auf, was einem hohen Reinheitsgrad entspricht.

Des weiteren wurde im 1%igem Agarosegel die RNA auf mögliche Degradierung überprüft. Bei einer unversehrten RNA sind die ribosomalen RNAs der 28S- und 18S- Partikel sowie oft auch niedermolekulare RNAs als deutlich getrennte Banden zu identifizieren. In Abb.11 ist die elektrophoretische Auswertung einer total-RNA-Isolierung aus undifferenzierten (U) und differenzierten (D) *C2C12*-Zellen zu sehen.



**Abb. 11 Gelelektrophorese der RNA aus *C2C12*-Zellen**

Das Elektrophoresebild zeigt die typischen Banden, die nach einer sauberen RNA-Isolierung entstehen (zwei hochmolekulare Banden für die 28S- und 18S- rRNA sowie oft auch eine niedermolekulare Bande für kleine rRNAs. Die RNA ist demzufolge noch im intakten Zustand.

M – DNA-Marker  $\lambda$  /EcoRI+HindIII

U – RNA aus undifferenzierten *C2C12*-Zellen

D – RNA aus differenzierten *C2C12*-Zellen

## 4.2.2 RT-PCR in der Flüssigphase

### 4.2.2.1 Amplifikation von Fragmenten aus verschiedenen Genen

Bevor der Nachweis der mRNA für die jeweiligen Gene mittels On-Chip-PCR erfolgen konnte, musste erst sichergestellt werden, dass die Sequenzausschnitte im normalen Flüssigphasen-RT-PCR-Experiment detektierbar sind.

Eine RT-PCR kann als One-Step- oder als Two-Step-Reaktion durchgeführt werden. Bei der Two-Step-Reaktion wird die Umschreibung der mRNA und anschließende PCR-Reaktion in zwei separaten Reaktionsansätzen durchgeführt. Bei der One-Step-Reaktion können beide Schritte in einem Reaktionsansatz realisiert werden.

Für den Nachweis aller Gensequenzen wurde eine Two-Step-RT-PCR im Reaktionsgefäß durchgeführt.

Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Sequenz im Anfangsbereich des Gens, d.h. in Nähe des Startcodons sowie eine Sequenz im Endbereich des Genes bzw. am 3'-Ende des jeweiligen mRNA-Transkriptes amplifizierten. Durch Kombination des forward-Primers aus dem Anfangsbereich mit dem revers-Primer aus dem Endbereich kann auch ein langes Fragment amplifiziert werden, das die gewählten Anfangs- und Endsequenzen umfasst.

Die Primer sind für folgende Gene spezifisch : Chrna1, Chrnb1, Chrnd und Chrne als Repräsentanten des Acetylcholinrezeptors in Muskelzellen; Chrna3 – eine Untereinheit des neuronalen nicotinic AChR ; Ckm – die Muskel-Creatinkinase , Myog - Myogenin sowie die Atpase Atp2a2.

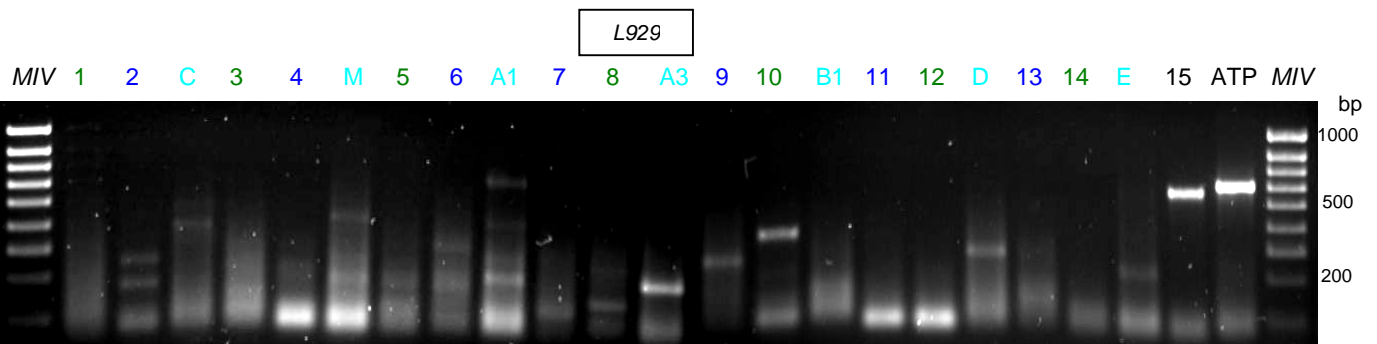
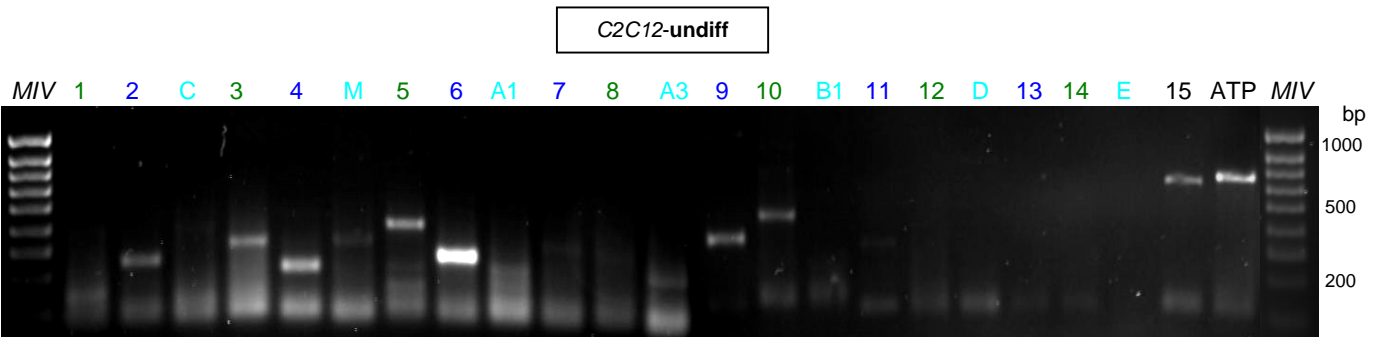
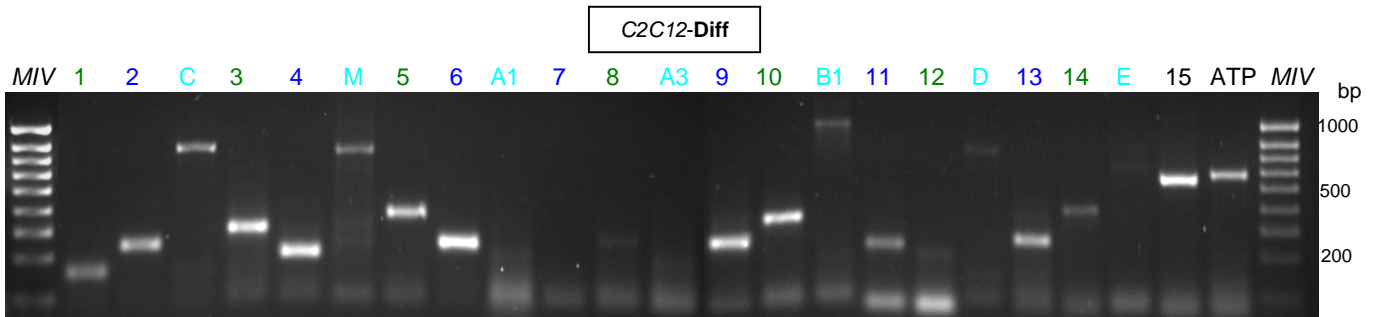
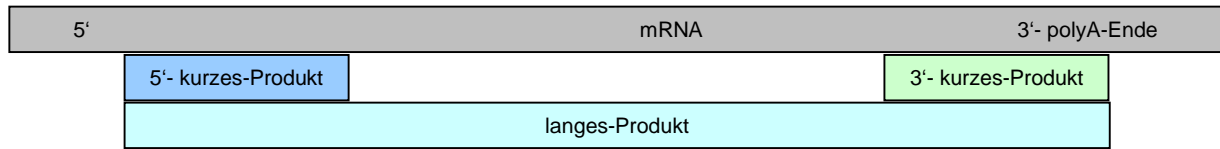
Als Matrizen wurden cDNA-Isolierungen aus sowohl undifferenzierten wie auch differenzierten *C2C12*-Zellen sowie *L929*-Zellen zum Vergleich eingesetzt.

In Abb.12 sind die Agarosegelauswertungen dieser RT-PCRs gezeigt.

Die kurzen PCR-Produkte sind nummeriert. Das entsprechende lange PCR-Produkt umspannt die beiden kurzen Sequenzbereiche und ist mit dem jeweiligen Anfangsbuchstaben des Gennamens bezeichnet.



Schema der amplifizierten Sequenzbereiche :



**Abb. 12 RT-PCR mit cDNA aus differenzierten, undifferenzierten C2C12-Zellen und L929-Zellen**

**oben** : Schema des Sequenzbereiches, der jeweils amplifiziert wurde ; **unten** : Agarosegelbilder der PCRs

**PCR-Produktbezeichnungen**: Nummerierung = kurzes PCR-Produkt aus Anfangs- und Endbereich der jeweiligen mRNA-Sequenz ; Buchstabe = langes PCR-Produkt, das Anfangs- und Endbereich der mRNA-Sequenz einschließt :

1, 2, C – Ckm ; 3, 4, M – Myog, ; 5, 6, A1 – Chrna1 ; 7, 8, A3 – Chrna3 ; 9, 10, B1 – Chrnb1 ; 11, 12, D – Chrnd  
13, 14, E – Chrne ; 15, ATP – Atp2a2

MIV – DNA-Marker IV (Bioline)

Bei Verwendung von cDNA aus differenzierten *C2C12*-Zellen als Matrizenmaterial waren die Sequenzbereiche aus dem Creatinkinase (Ckm)-, Myogenin (Myog)-, Atp2a2 (ATP)- Gen sowie den Acetylcholinrezeptorgen *Chrna1* und *Chrnb1* gut amplifizierbar. Schwach amplifizierbar ist das Acetylcholinrezeptorgen *Chrne* und kein detektierbares Signal im Agarosegel ergab das Acetylcholinrezeptorgen *Chrna3*. Die Amplifikation der langen Fragmente erfolgte nicht unter optimalen Bedingungen, da beim Primerdesign nur Primersequenzen für die kurzen Fragmente berücksichtigt wurden. Mit Ausnahme der *Chrna1*- und *Chrna3*- Gensequenzen konnten dennoch lange Fragmente synthetisiert werden.

Der Vergleich der PCRs mit cDNA-Matrizen aus undifferenzierten *C2C12*-Zellen zeigt, dass die einzelnen Fragmente schwächer oder scheinbar gar nicht amplifiziert werden. Nur die Sequenzbereiche aus dem Myogenin (Myog), Atp2a2 (ATP)- und Acetylcholinrezeptorgen *Chrna1* und *Chrnb1* werden deutlich synthetisiert.

Der unterschiedliche Differenzierungszustand der *C2C12*-Zellen kann somit anhand einzelner Gene mittels PCR festgestellt werden.

Bei den PCRs mit cDNA-Matrizen aus *L929*-Zellen konnten nur das Atp2a2-Gen und etwas schwächer die kurzen *Chrnb1*-Gensequenzbereiche amplifiziert werden. Auffällig bei den anderen PCR-Reaktionen ist die Bildung von unspezifischen Produkten.

In Tab.13 sind die Ergebnisse der RT-PCR nochmals zusammengefasst.

**Tab. 13 Ergebnisse der RT-PCRs mit verschiedenen cDNA-Matrizen**

<i>Herkunft der cDNA-Matrize (Zelltyp) / Gen (PCR-Fragment)</i>	<i>C2C12-Diff</i>	<i>C2C12-undiff</i>	<i>L929</i>
<b>Chrna1</b>	++	++	-
<b>Chrna3</b>	-	-	-
<b>Chrnb1</b>	++	+	+
<b>Chrnd</b>	+	+/-	-
<b>Chrne</b>	+	-	-
<b>Ckm</b>	++	+/-	-
<b>Myog</b>	++	+	-
<b>Atp2a2</b>	++	++	++

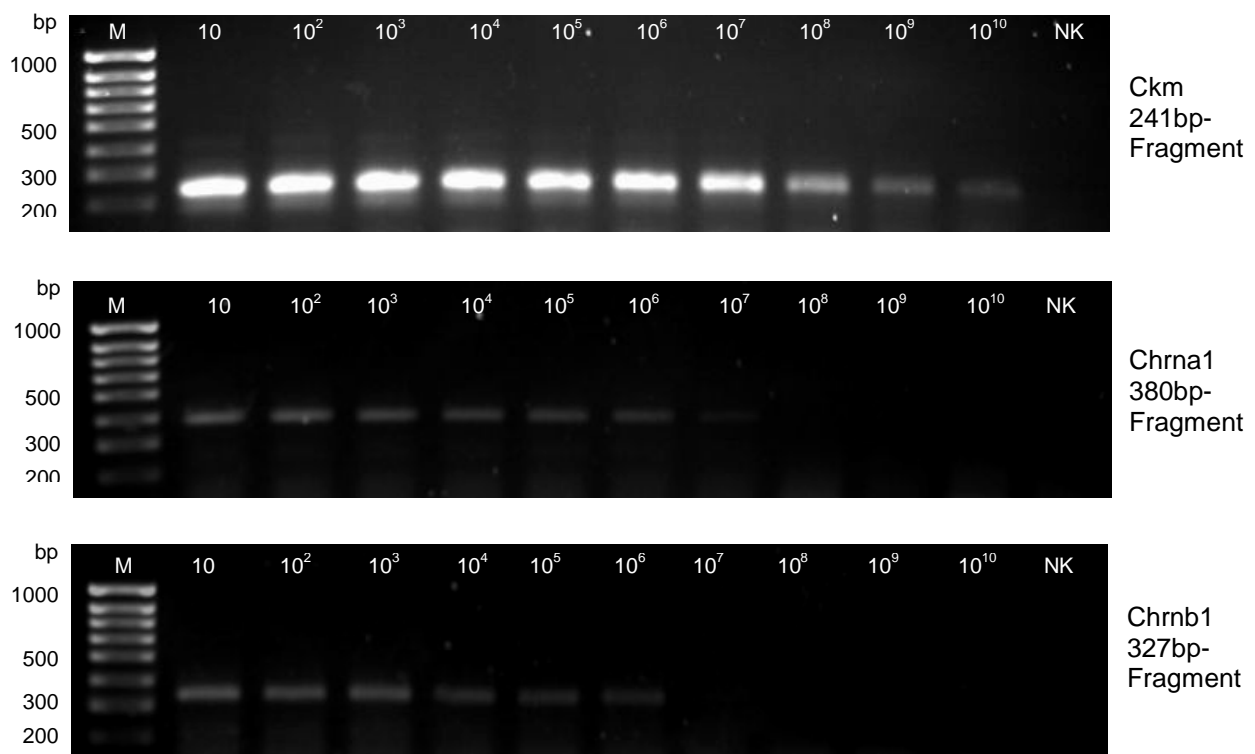
Amplifizierbarkeit: ++ sehr gut , + gut , +/- schwach , - kein Amplifikationssignal

Wie in Tab.13 gezeigt, liegen bei allen cDNA-Matrizen das *Chrb1*- und das *Atp2a2*- Gen in einer gut amplifizierbaren Form vor. Die Sequenzen aus der  $\alpha 3$  (*Chrna3*)- Untereinheit konnten bei keiner Matrize amplifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da die *Chrna3*-Untereinheit nur im neuronalen Rezeptortyp vorkommt, der hier jedoch nicht vorlag. Deutliche Unterschiede zwischen *C2C12*- und *L929*- Zellen zeigen die PCR-Produkte für die Gene *Chrna1* und *Chrnd*. Innerhalb der *C2C12*-Zellen ist hinsichtlich ihres Differenzierungszustandes ein deutlicher Unterschied nur beim *Chrnd*- und vor allem beim *Chrne*- Gen zu bemerken, da dieses nur bei den differenzierten Zellen identifiziert werden konnte.

Die RT-PCR bietet somit eine Möglichkeit, zwischen verschiedenen Zelltypen diskriminieren zu können und sogar eine Aussage über den Differenzierungszustand zu treffen.

#### 4.2.2.2 PCR mit unterschiedlichen Matrizenkonzentrationen

Für einzelne Fragmente wurde die PCR mit abnehmenden Matrizenkonzentrationen durchgeführt. Über asymmetrische PCR oder Lambda-Exonuklease-Verdau wurden einzelsträngige Matrizen für die entsprechenden PCR-Produkte (Genfragmente) hergestellt. Nach Aufreinigung der jeweiligen einzelsträngigen Matrize wurde eine Standardkonzentration von 50 ng/μl eingestellt. Diese Standardkonzentration wurde für die einzelnen PCR-Reaktionen von 1:10 bis 1:10<sup>10</sup> verdünnt und als Matrizenmenge eingesetzt.



**Abb. 13 PCR mit abnehmenden Matrizenkonzentrationen**

Die Standardkonzentration der einzelsträngigen Matrize betrug 50ng und wurde in den Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10<sup>10</sup> in der PCR eingesetzt. Die Amplifikation einzelner Genfragmente ist bis zu einer Konzentration von 50fg nachweisbar. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse der Agarosegelauswertungen für die PCR-Reaktionen der Fragmente aus den Genen Creatinkinase (Ckm), Acetylcholinrezeptor-Untereinheit Alpha1 (Chrna1) und Acetylcholinrezeptor-Untereinheit Beta1 (Chrb1) dargestellt.

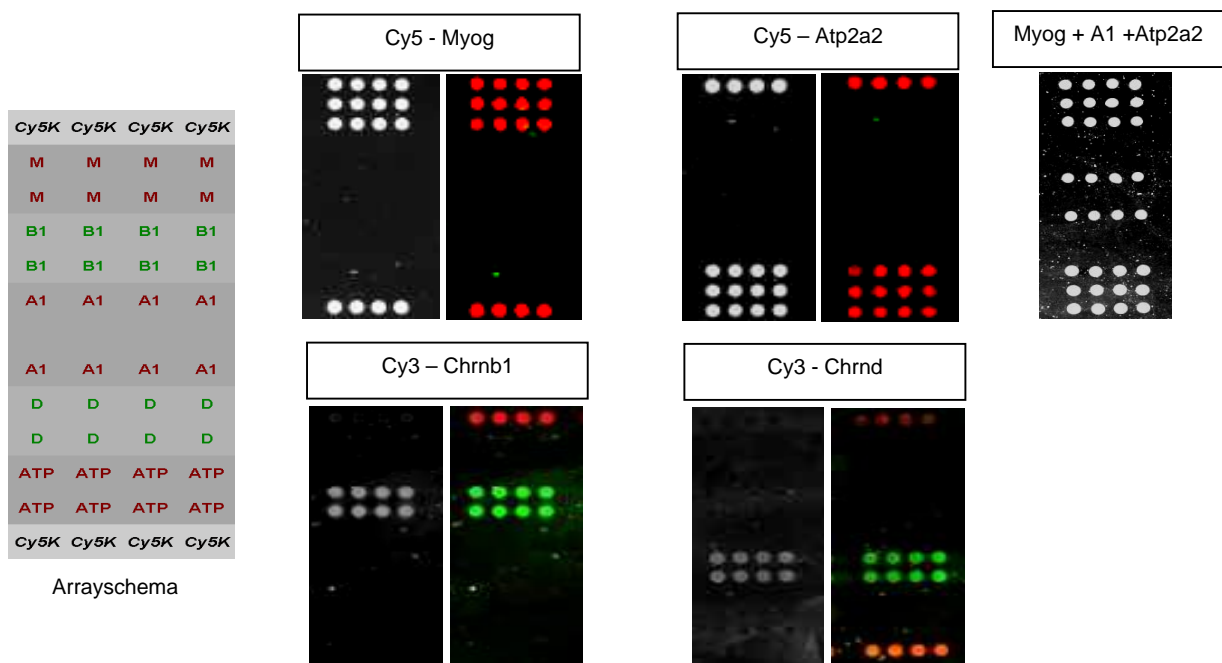
In Abb.13 sind beispielhaft die Agarosegelauswertungen der PCR-Reaktionen mit abnehmenden Matrizenkonzentrationen für Sequenzen aus den Ckm-, Chrna1- und Chrb1-Genen dargestellt. Wie diese Abbildung zeigt, ergibt die PCR bis zu einer Verdünnung der Matrize von 1:10<sup>6</sup> (entspricht  $50 \cdot 10^{-6}$  ng = 50 fg) noch positive Signale im Elektrophoresegel. Bei den PCR-Produkten aus den Myog-, Ckm- und Atp2a2- Genen ist eine nachweisbare Amplifikation von nur  $50 \cdot 10^{-4}$  fg (entspricht 5 Attogramm bzw. 3 Molekülen bei bp=300) noch möglich.

### 4.2.3 Hybridisierung der PCR-Produkte an immobilisierten Sonden

Bevor die RT-PCR an immobilisierten Primern versucht wurde, musste die Spezifität der immobilisierten Oligonukleotide (Primer) sowie auch der PCR-Produkte getestet werden. Dazu wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt, wobei die gekoppelten Primer (for-Primer) die Funktion von spezifischen Sonden erfüllten.

Durch Einbau von fluoreszenz-markierten Primern (rev-Primer) wurden Cy5- oder Cy3-gelabelte PCR-Produkte synthetisiert. Zum Hybridisieren wurden die gelabelten einzelsträngigen PCR-Produkte eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden durch Lambda-Exonuklease-Verdau einzelsträngig gemacht. Alternativ konnten Einzelstränge auch durch asymmetrische PCR generiert werden.

Das Ergebnis von Abb.14 zeigt, dass alle PCR-Produkte spezifisch an ihren Sonden hybridisierten. Ausgehend von diesem Resultat konnte ein On-Chip-PCR-System aufgebaut werden, dessen Ergebnisse in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden.



**Abb. 14 Hybridisierung von einzelsträngigen PCR-Produkten**

**links** : Arrayschema (M – Myog (Cy5), ; A1 - Chrna1 (Cy5) ; B1 – Chrnb1 (Cy3) ; D – Chrnd (Cy3); ATP – Atp2a2 (Cy5) ; Cy5K – Cy5-Immobilisierungskontrolle)

**rechts** : Scanaufnahmen der Hybridisierungen. Es wurden jeweils 100ng ssDNA hybridisiert.

Die Scans wurden am ArrayWorx bei 682nm für Cy5 und 595nm für Cy3 aufgenommen.

Die Aufnahmen sind hier im Graustufen- sowie Falschfarbenbild (bei Parallel-Scans) dargestellt (Cy5 = rot, Cy3 = grün).

## 4.2.4 On-Chip-RT-PCR

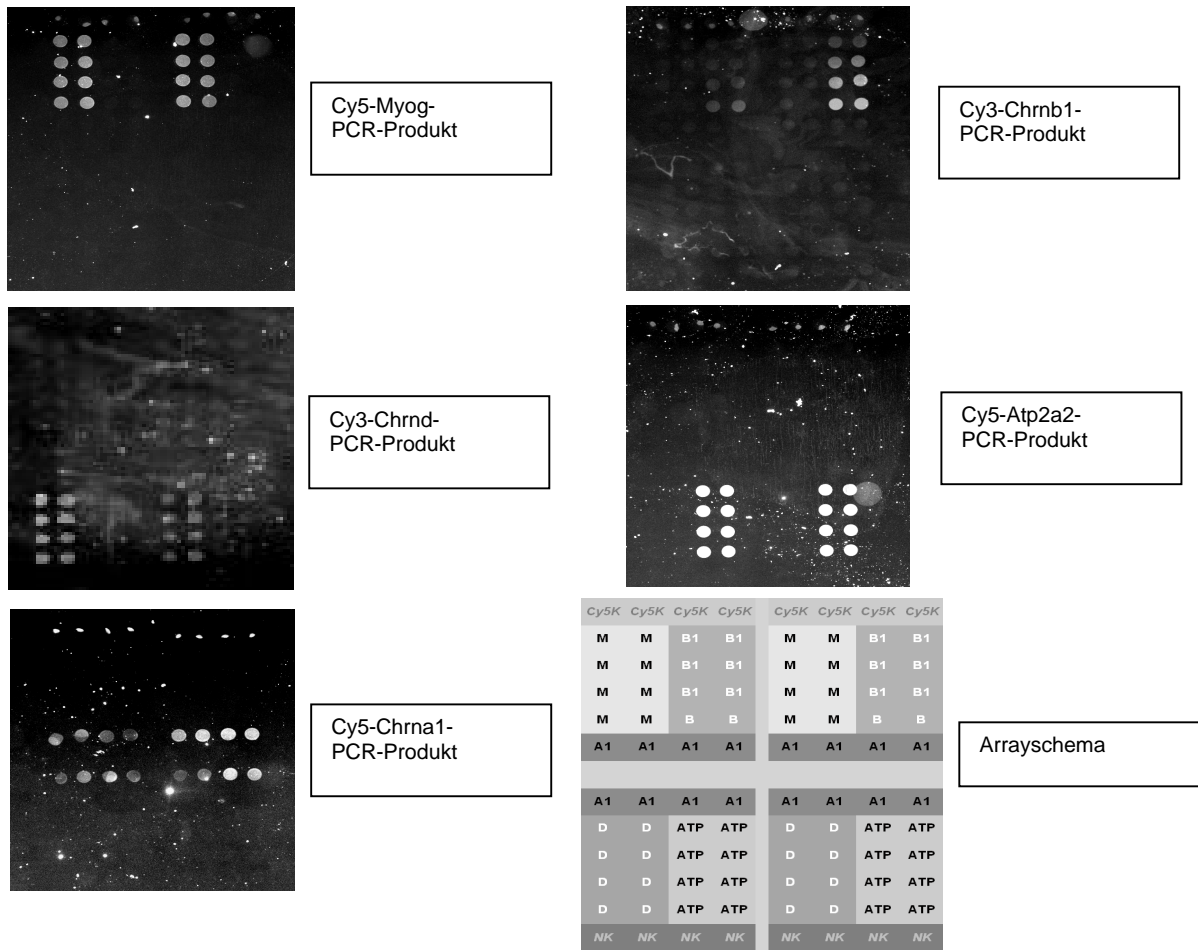
### 4.2.4.1 Singleplex –On Chip- RT- PCR

Nach erfolgreicher Two-Step-RT-PCR als Flüssigphasenreaktion wurden diese Reaktionen an immobilisierten Primern auf der Chipoberfläche durchgeführt. Als Auswahl wurden die Genfragmente *Atp2a2*, *Myog*, *Ckm*, *Chrna1*, *Chrb1* und *Chrnd* auf der Oberfläche synthetisiert. Als Matrize wurde cDNA abstammend von differenzierten *C2C12*-Zellen eingesetzt. Das Gesamt-Array wurde so gestaltet, dass es 2 bis 4 identische Klein-Arrays enthält. Dadurch können Inhomogenitäten auf der Oberfläche bei der Auswertung berücksichtigt und gleichzeitig eine Statistik der Reproduzierbarkeit von Signalen erstellt werden.

In Abb.15 ist die Scan-Auswertung der einzelnen On-Chip-PCRs mit cDNA aus differenzierten *C2C12*-Zellen abgebildet. Die Kopplung der immobilisierten (forward)-Primer sowie der Kontroll-Oligonukleotide auf der Oberfläche erfolgte über die EDC-Methode. Die eingesetzten freien Gegenstrang (revers)-Primer waren am 5'-Ende Cy5- oder Cy3-markiert. Zusätzlich zum markierten Primer wurde in geringerer Konzentration noch jeweils der forward-Primer als freier Primer zur Reaktion zugegeben. Dadurch konnte zunächst eine Flüssigphasen-Reaktion starten, die dann als Starthilfe für die Festphasen-Reaktion diente. Für das Ergebnis war es unerheblich, welche Primerpaarung (Abb.3, S.35) eingesetzt wurde. Beide kurzen Fragmente sowie auch das lange Fragment ergaben positive Spotsignale bei der On-Chip-PCR.

Für eine gut detektierbare Reaktion wurden die einzelnen Reaktionen optimiert. Dies konnte durch Konzentrationsverhältnisse der freien Primer in Lösung, Erhöhen der Magnesiumionen-Konzentration sowie Zugabe von DMSO erreicht werden. Die einzelnen Optimierungen werden im nächsten Kapitel erläutert.

Die Signal-Hintergrundverhältnisse konnten in weiteren Experimenten durch Einsatz von geeigneten Block- und Waschlösungen verbessert werden.



**Abb. 15 On-Chip-PCR mit cDNA**

Die PCR erfolgte als Two-Step- RT-PCR mit cDNA aus differenzierten *C2C12*-Zellen als Matrize. Die PCR-Produkte wurden durch Extension Cy5- bzw. Cy3- markierter Primer an der Oberfläche synthetisiert. Die Scans für Cy5-Produkte und das Cy5-Kontroll-Oligonukleotid wurden bei 682 nm, für Cy3-Produkte bei 595 nm am ArrayWorx-Scanner aufgenommen.

Bezeichnungen im Arrayschema:

M – Myog , B1 – Chrnb1, A1 – Chrna1, D – Chrnd, ATP – Atp2a2

Cy5K – Cy5-Kontroll-Oligonukleotid als Kopplungskontrolle,

NK – Negativkontroll-Oligonukleotid

#### 4.2.4.2 Optimierung der On-Chip-PCR

Zur Optimierung der Reaktion wurden folgende Parameter in Betracht gezogen:

Zugabe von PCR-additiven Reagenzien wie DMSO, Formamid oder Betain;

Erhöhen der Magnesiumionen-Konzentration;

Optimierung des Primerverhältnisses sowie

Auswahl einer geeigneten PCR-Polymerase.

Die Zugabe der oben genannten PCR-Additive bewirkt ein Herabsetzen der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von DNA-Doppelsträngen. So führt z.B. jedes zugesetzte Prozent von Formamid in Hybridisierungspuffern zu einer Senkung der Schmelztemperatur von  $0,6^\circ\text{C}$ - $0,8^\circ\text{C}$  (Stahl & Amann 1991, Sambrook et al. 2001). Außerdem wird durch Erhöhen der Viskosität des Reaktionsmixes die Geschwindigkeit der Molekülbewegung reduziert. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Reaktionspartner (z.B. DNA-Polymerase und DNA-Primer-Hybrid) in einer Lösung beim Aufeinandertreffen miteinander reagieren.

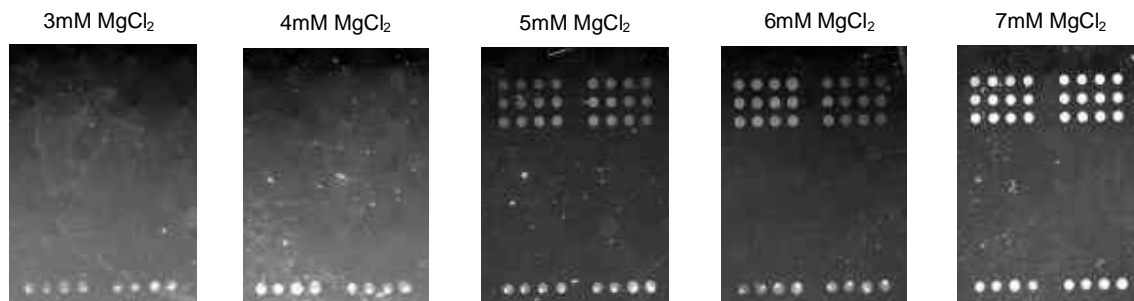
Die PCR-Additive DMSO und Formamid wurden anteilig von 0,5 – 10 % und Betain in einer Konzentration von 0,5 - 3 M pro Reaktion getestet. Als optimale On-Chip-PCR-Additive wurden schließlich 5% DMSO oder 1 - 1,5 M Betain ermittelt. Die Zugabe von Formamid führte zu keinem verbesserten Ergebnis.

Die Zugabe von DMSO bzw. Betain entfiel, wenn das Self Seal Reagent – System (MJ Research) verwendet wurde. Mit diesem Reagenz kann eine Reaktion unter einem Glasdeckgläschen durchgeführt werden ohne ein vollständiges Versiegeln der Reaktionskammer z.B. durch einen Kleberahmen (PCR-Rahmen) notwendig zu machen. Durch Substanzen in dem Reagenz wird laut Herstellerangaben eine Evaporationbarriere am Deckgläschenrand errichtet, sodass *in situ*- Reaktionen durchgeführt werden können. Da diese Lösung eine höhere Viskosität als Wasser besitzt, wird bei der On-Chip-PCR ein ähnlicher Effekt wie durch Zugabe von DMSO erreicht. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des Self Seal Reagent ist das geringe Reaktionsvolumen von 10  $\mu\text{l}$ . Dagegen erfordern die Klebe-PCR-Rahmen als Reaktionskammern ein Reaktionsvolumen von mindestens 25  $\mu\text{l}$ .

Ein wichtiges Ergebnis für die Effektivität der On-Chip-PCR brachte die Optimierung der Magnesiumionen-Konzentration. Magnesiumionen sind ein wichtiger Cofaktor für die Funktion von DNA-Polymerasen. In konventionellen PCR-Reaktionen in Lösungen wird eine Konzentration von 1,5 - 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  eingesetzt. Eine höhere Konzentration kann zu unspezifischen Amplifikationen führen.

Bei der On-Chip-PCR dagegen steigerte eine Erhöhung der  $\text{Mg}^{2+}$ - Konzentration bis zu 7 mM erheblich die Effektivität ohne die Spezifität zu beeinflussen (Abb.16).



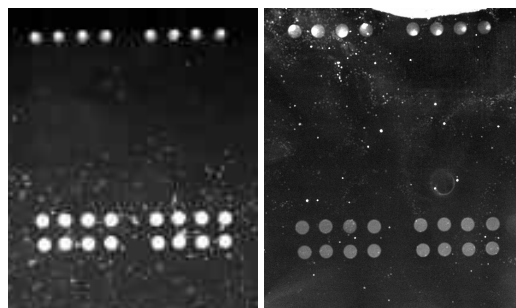


**Abb. 16 Optimierung der Magnesiumionen-Konzentration**

Eine Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration auf 5-7 mM steigert die Effektivität der On-Chip-PCR an immobilisierten Primern. Die PCR wurde mit Cy5-Primern durchgeführt, amplifiziert wurde eine Sequenz aus dem Myog-Gen (Dreifach-Spotreihe). Die unterste Spotreihe stellt die Cy5-Kontrolle zur Überprüfung der Kopplungsreaktion dar. Zwischen den Myog-Primer- und der Cy5-Kontrollspots sind weitere Primer für andere Gensequenzen immobilisiert. Da diese keine Signale nach der Reaktion ergeben, ist die Spezifität nicht beeinflusst. Die Scanbilder wurden am ArrayWorx-Scanner bei 682nm unter gleichen Bedingungen aufgenommen.

Neben der Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration erwies es sich auch als vorteilhaft, wenn der immobilisierte Primer zusätzlich frei in Lösung zum Reaktionsmix gegeben wurde. Somit erforderte die On-Chip-PCR mit cDNA als Matrize im Gegensatz zu der On-Chip-PCR mit *M13*-DNA bei einigen Reaktionen die Zugabe des immobilisierten Primers als freien Primer. Als günstiges Primerverhältnis zwischen immobilisiertem zusätzlichem freien Primer und notwendigem freien Gegenstrang-Primer erwies sich eine Ratio von 1:10 bis 1:20.

Als weitere Optimierungsmöglichkeit wurden verschiedene PCR-Polymerasen (*Taq* DNA Polymerase LC, Fermentas, BioTaq, Bioline) bzw. z.T. hitzeaktivierbare Polymerasegemische (Immolase, Bioline; Titanium, Clontech; Elongase, Invitrogen) ausgetestet. Im Vergleich funktionierten alle Polymerasen, eine bessere Sensitivität wurde mit den Polymerasegemischen erreicht (Tab.14). Deshalb wurden die meisten Versuche mit Immolase durchgeführt (Abb.17).



**Abb. 17 Vergleich von On Chip –PCRs mit Immolase und Taq-Polymerase LC**

Die PCR wurde mit Cy5-Primern durchgeführt, die sequenzspezifisch für das *Atp2a2*-Gen sind (zweifache Spotreihe). Beide PCRs wurden unter gleichen Bedingungen bei 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt.

links: PCR mit Immolase (Bioline)

rechts: PCR mit Taq Polymerase LC (Fermentas)

oberste Spotreihe: Cy5-Kontrolle

**Tab. 14 Eignung verschiedener Polymerasen bzw. Polymerasegemische für On-Chip-PCR**

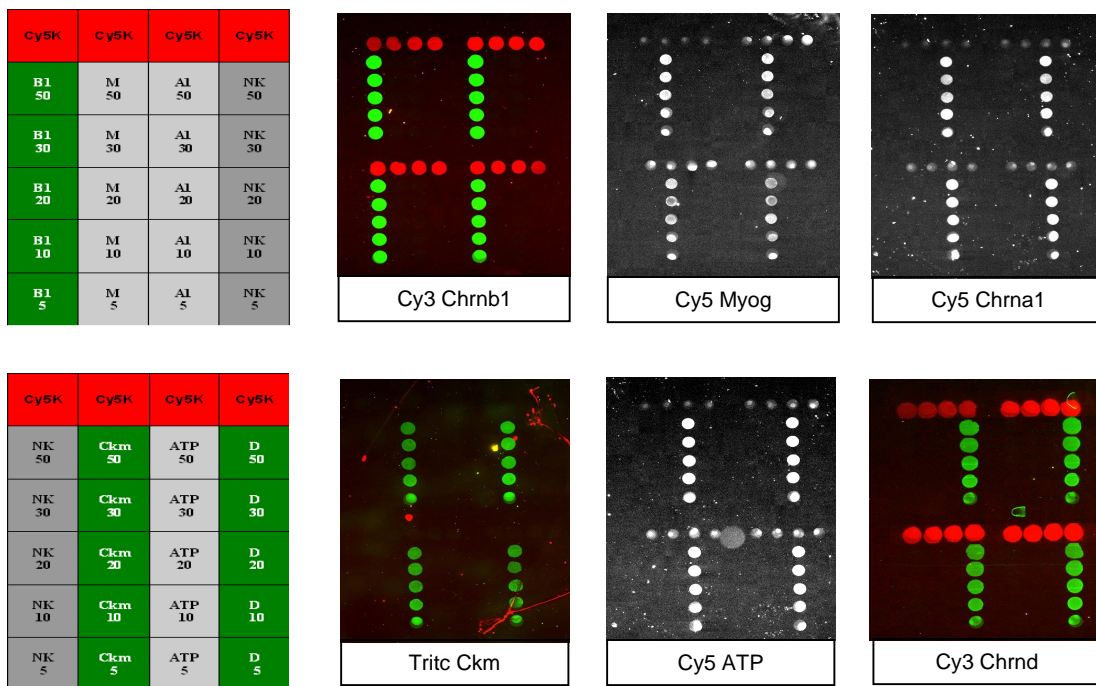
PCR-Polymerase (Hersteller)	Besonderheit	Eignung für On-Chip-PCR
<b>Taq DNA Polymerase recombinant LC</b> (MBI Fermentas)	einfache <i>Taq</i>	+
<b>BIOTAQ™</b> DNA Polymerase (BIOLINE)	einfache <i>Taq</i>	+
<b>CombiZyme</b> DNA Polymerase Mix (Invitex)	Enzymmix ( <i>Taq</i> + <i>Tth</i> inorganic phosphatase)	+
<b>Elongase®</b> Enzyme Mix (Invitrogen)	Enzymmix ( <i>Taq</i> + <i>Pyrococcus</i> species)	+++
<b>IMMOLASE™</b> DNA Polymerase (BIOLINE)	Hitze-Aktivierung (7min bei 95°C)	+++
<b>Titanium™</b> <i>Taq</i> DNA Polymerase (Clontech)	Hitze-Aktivierung durch Antikörper-Inhibition	++

Die Bewertung zur Eignung für die On-Chip-PCR erfolgte nach Detektierbarkeit der Reaktionsspot-Signale :  
 + ++ sehr gut , ++ gut , + ausreichend

#### 4.2.4.3 On Chip- RT- PCR an verschieden gespotteten Primerkonzentrationen

Wie bei den Versuchen mit *M13*-DNA wurden diese On-Chip-PCRs an immobilisierten Primern, die in unterschiedlicher Konzentration gespottet wurden, durchgeführt. Es wurde eine Spottingkonzentration der Primer von 5 $\mu$ M bis 50 $\mu$ M eingesetzt. Die eingesetzte Matrizenmenge der cDNA betrug 20ng. Die Reaktionen wurden auf silanisierten Glasträgern aus eigener Herstellung oder der Firma Genetix durchgeführt.

In Abb.18 sind die Scanbilder für die einzelnen On Chip-PCR-Produkte zu sehen.



**Abb. 18 On Chip – RT-PCR an unterschiedlich konzentrierten gespotteten Primern**

Es wurden 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M- Primerkonzentrationen am TopSpot (Arrayschema 4x6-4fach) gespottet. Alle PCR-Reaktionen erfolgten mit der gleichen Matrizenmenge und den gleichen Primerverhältnissen (siehe Kapitel Methoden) Die Fluoreszenzbilder wurden am ArrayWorx-Scanner aufgenommen.

Bezeichnungen im Arrayschema:

oben : B1 – Chrbn1, M – Myog ,A1 – Chrna1,

unten : Ckm – Ckm, ATP – Atp2a2, D – Chrnd

Cy5K – Cy5-Immobilisierungskontrolle (10 $\mu$ M),

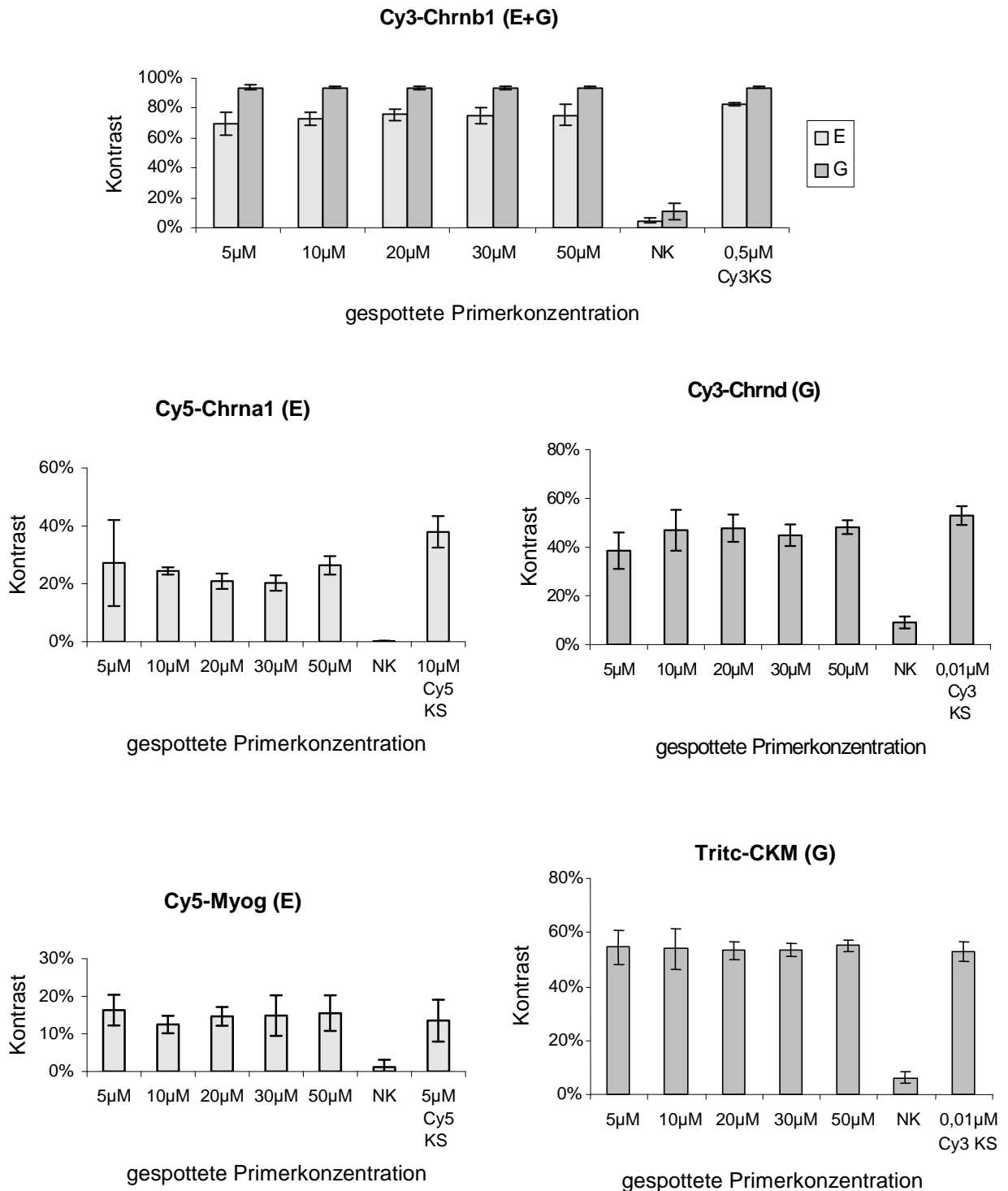
NK – Negativkontroll-Oligomer

Anscheinend gibt es keine merklichen Unterschiede zwischen den Reaktionsspoten trotz der unterschiedlichen Primerkonzentrationen. Diese Beobachtung konnte durch Ermitteln der Fluoreszenzintensitäten sowie der Kontrastwerte aus den Rohdaten (unskalierte Tif-Werte) bestätigt werden.

Als Beispiel sind in Abb.19 (S.63) die Kontrastvergleiche einiger On-Chip-PCR-Produkte dargestellt. Die Auswertung der Kontrastwerte zeigt keine Unterschiede innerhalb der Spots für die verschiedenen Konzentrationen. Dennoch ist auffällig, dass die Werte für Cy3-Spots bis zu 50% höher sind als für Cy5-Spots. Dieses Ergebnis ist unabhängig von den

verwendeten Chipoberflächen (eigene silanisierte Glasträger (E) oder Genetix-Glasträger (G)) und bestätigt die Aussagen anderer Arbeiten, die belegen, dass zwischen den Farbstoffen Cy3 und Cy5 ein Ungleichgewicht in der Intensität besteht (Yue et al. 2001, Yuen et al. 2002, Yang et al. 2002). Zum Vergleich wurden zudem die Spotwerte von Kalibrierchips in die Diagramme einbezogen. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Cy5- und Cy3-markierten Oligonukleotiden auf silanisierte Glasträger (E bzw. G) getropft und nach dem Eintrocknen gescannt. Mit Hilfe der ImaGene<sup>TM</sup>-Software (BioDiscovery) wurden die Kontrastwerte der einzelnen Spots ermittelt. Da diese Kalibrierspots keine weitere Behandlung wie Waschen, Blocken oder Temperaturänderungen erfuhren, sind deren Werte genau definiert für die entsprechenden gespotteten Konzentrationen. Das heißt, dass nach Behandlung der Chips (durch Waschen, Blocken, Reaktion) die tatsächlich gekoppelte Belegungsichte geringer ist als die Initialbelegungsichte direkt nach dem Spotten. Die Belegungsichte von gekoppelten Oligonukleotiden beträgt 10-20 fmol/mm<sup>2</sup> (Kleinjung 1998, Heise 2004) Die Konzentration nach der PCR-Reaktion ist 10-100fach geringer gegenüber der Spottingkonzentration.

So liegen im Fall des Cy5-Chrna1-PCR-Produktes die Kontrastwerte der Reaktionsspots im Bereich der aufgetropften 10µM-Konzentration des Kalibrierchips, die Werte des Cy3-Chrnd-PCR-Produktes dagegen im 0,01µM-Konzentrationsbereich des Kalibrierchips (Abb.19).



**Abb. 19 Vergleich der Kontrastwerte der OnChip-PCR-Produkte, synthetisiert an verschiedenen gespotteten Primerkonzentrationen**

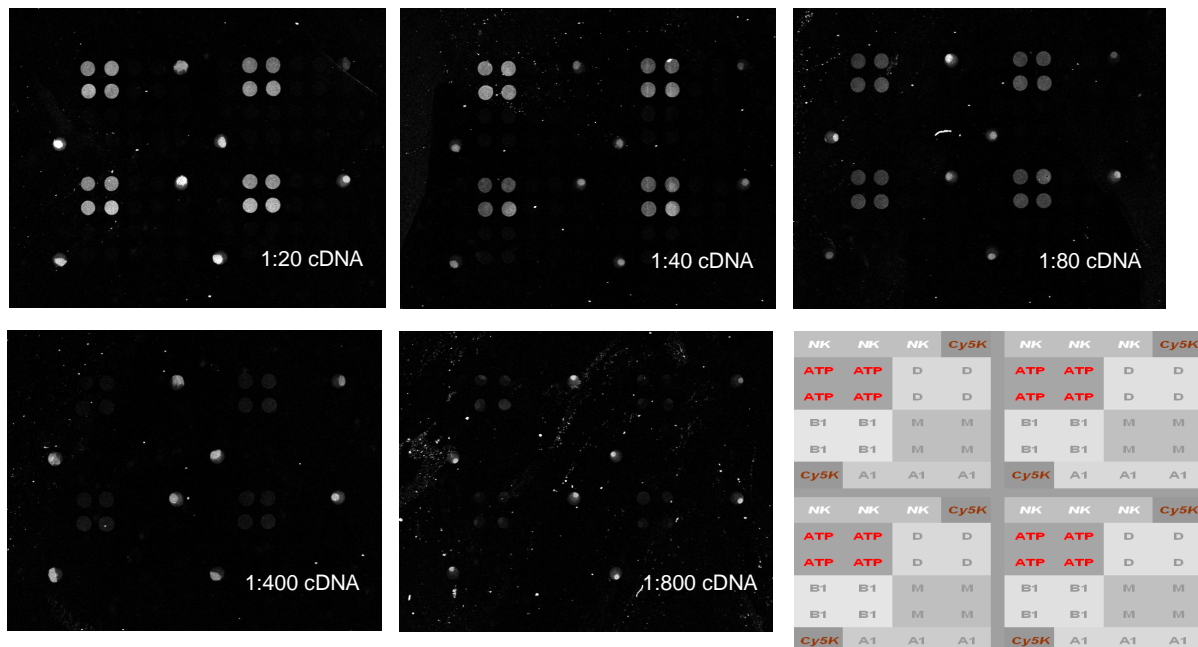
Dargestellt sind die Kontrastwerte (Mittelwerte aus n=20) der PCR-Spots für die PCR-Produkte Cy3-Chrnb1, Cy5-Chrna1, Cy3-Chrnd, Cy5-Myog und Tritc-Ckm, die zu den Spotbildern von Abb.19 gehören. Die Reaktionen wurden auf silanisierten Chips eigener Herstellung (E) oder der Firma Genetix (G) durchgeführt. Neben den Werten für die jeweiligen Primerkonzentrationen von 5-50µM wurden die Werte des zugehörigen Kalibrierchips (KS) sowie für die Negativkontrolle (NK) in die Auswertung einbezogen.

#### 4.2.4.4 On Chip- RT- PCR mit verschiedenen cDNA-Matrizenkonzentrationen

In den Standardreaktionen wurde immer eine cDNA-Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Dazu wurden 1-2µg total RNA in einer 25µl-Reaktion in cDNA über Reverse Transkription (RT) umgeschrieben und nach der Synthese 1:20 verdünnt, was ca. 20ng ssDNA entspricht (siehe Kapitel 3.7, S.23).

In Abb.20 wurden für die On-Chip-PCRs weitere cDNA-Verdünnungen eingesetzt. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:80 (ca. 5ng ssDNA) sind deutliche Signale zu detektieren. Ab einer 1:400 – Verdünnung (ca. 1ng ssDNA) werden die Spotintensitäten für das gebildete PCR-Produkt deutlich schwächer, aber wären bei empfindlicheren Scan- bzw. Bildeinstellungen noch gut zu identifizieren.

Ausgehend von 1µg RNA<sub>total</sub> als Startmaterial ist diese Menge sehr viel geringer als bei üblichen Mikroarray-Experimenten, bei denen mind. 25µg notwendig sind (Wendisch et al. 2001, Dudley et al. 2002, Klur et al. 2003).



**Abb. 20 On Chip- PCR mit verschiedenen cDNA-Konzentrationen**

Die cDNA wurde zuvor aus 1µg RNA durch Reverse Transkription in einer 25µl-Reaktion hergestellt und anschließend 1:20 als Standardkonzentration verdünnt (entspricht hier 20ng ssDNA). Für diesen Versuch wurde diese cDNA-Lösung weiter bis zu einem Verdünnungsfaktor von 1:800 verdünnt und in der On Chip-PCR eingesetzt. Amplifiziert wurde eine Sequenz aus dem Atp2a2-Gen (siehe Arrayschema rechts unten). Der Scan der Arrays erfolgte unter gleichen Bedingungen bei 682nm am Affymetrix-Scanner bei einer Gain-Einstellung von 60db.

#### 4.2.4.5 Duplex –On Chip- RT- PCR

Die On-Chip-PCR mit cDNA als Matrize wurde in einem weiteren Versuch als Duplex-PCR durchgeführt, d.h. zwei Produkte wurden gleichzeitig in einem Reaktionsansatz an ihren entsprechenden immobilisierten Primern synthetisiert.

Ein exemplarisches Ergebnis dazu zeigt Abb.21. Hier wurde je eine Sequenz des Myog- sowie des Chrnd- Genes simultan in einer Reaktion auf der Oberfläche amplifiziert. Zur Unterscheidung der beiden Gensequenzen wurde ein Cy3- markierter Primer für Chrnd und ein Cy5- markierter Primer für Myog in dieser Duplex-PCR eingesetzt. Durch Scannen bei 595 nm für Cy3 und 682 nm für Cy5 konnten beide PCR-Produkte parallel detektiert werden. Zur Kontrolle wurde das selbe Array auch nur im 682nm-Kanal gescannt, um falschpositiv leuchtende Spots auszuschließen. Bei dieser Wellenlänge sind nur die Cy5-markierten Spots zu sehen, was die Spezifität der entstandenen Produkte bestätigt.



**Abb. 21 Duplex-On-Chip-PCR**

Diese On-Chip-PCR erfolgte als Two-Step-RT-PCR an immobilisierten Primern mit cDNA aus differenzierten *C2C12*-Zellen. Es wurden Cy5- gelabeltes Myog-Gen-PCR-Produkt (obere Dreifach-Spotreihe) und Cy3- gelabeltes Chrnd-Gen-PCR-Produkt (untere Dreifach-Spotreihe) simultan in einer Reaktion synthetisiert.

**links:** Simultanscan am ArrayWorx bei 595nm und 682nm für Cy3 bzw. Cy5- gelabelte PCR-Produkte sowie das Cy5-Kontroll-Oligonukleotid (Cy5K)

**mitte:** Scan des selben PCR-Arrays bei nur 682nm (Cy5)

**rechts:** Arrayschema (NK - Negativkontroll-Oligonukleotid, Cy5K - Cy5-Kontroll-Oligonukleotid, M - Myog, B1- Chrnb1 , A1 – Chrna1, D - Chrnd)

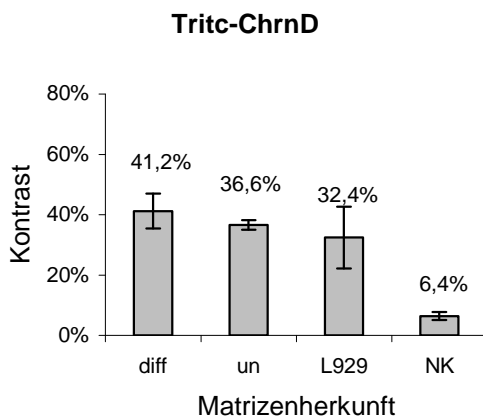
#### 4.2.4.6 On Chip- RT- PCR mit verschiedenen cDNA-Matrizen

Um die Anwendbarkeit und Sensitivität der RT-PCR an der Oberfläche gegenüber der Flüssigphasenreaktion zu testen, wurden die verschiedenen cDNA-Matrizen eingesetzt. Diese cDNAs entstammen den Reversen Transkriptionen der RNA aus differenzierten und undifferenzierten *C2C12*-Zellen sowie aus *L929*-Zellen. Als PCR-Produkte zur Diskriminierung dieser Zelltypen wurden Sequenzausschnitte aus dem *Chrnd*- und *Chrb1*-Gen gewählt, da diese schon bei der Flüssigphasen-PCR unterscheidbare Ergebnisse je nach Zelltyp vorwiesen (siehe Abb.12, S.51 und Tab.13, S.54).

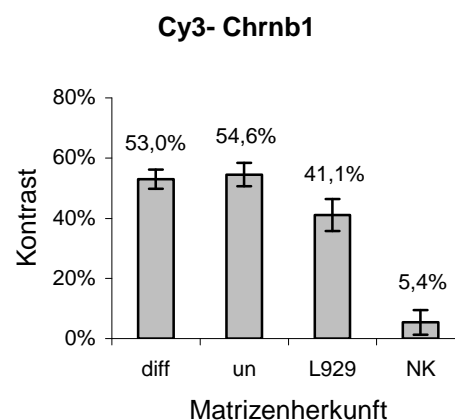
Die Ergebnisse der On-Chip-Reaktionen sind in Abb.22 dargestellt. In allen Reaktionen konnte unabhängig von der Herkunft der cDNA-Matrize das entsprechende Gen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterscheidet sich erheblich von dem der Flüssigphasenreaktion, wo für die *L929*-cDNA gegenüber den *C2C12*-cDNAs deutlich kein PCR-Produkt für das *Chrnd*-Gen nachzuweisen war. Die On-Chip-PCR dagegen zeigt nur verminderte Kontrastwerte, die sich um max. 10% unterscheiden.

Diese Versuche wurden nur einmal durchgeführt, da in dieser Arbeit die Etablierung der Methode im Vordergrund stand. Für eine ausführliche Auswertung müssten jedoch weitere Daten aufgenommen werden.

**A**



**B**



**Abb. 22 Vergleich der Kontrastwerte für On-Chip-PCRs mit verschiedenen cDNA-Matrizen**

Die On-Chip-PCR wurden mit cDNA-Matrizen, hergestellt aus verschiedenen Zelltypen, durchgeführt : diff – differenzierte *C2C12*-Zellen ; un – undifferenzierte *C2C12*-Zellen ; *L929*-Zellen. Als Primer zur Detektion wurden Tritc- bzw. Cy3-markierte Oligonukleotide verwendet.

**A** *Chrnd* – PCR-Rprodukt aus den *Chrnd*-Gen ; **B** *Chrb1* - PCR-Rprodukt aus den *Chrb1*-Gen

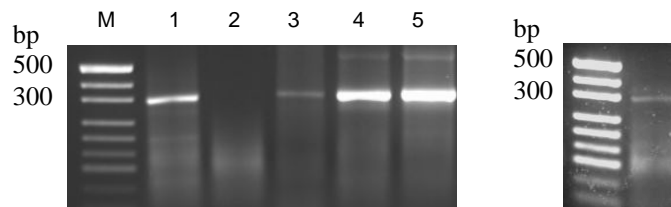


### 4.3 One Step-RT-PCR

Bei der One Step-RT-PCR wird in einem Reaktionsansatz die RNA in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern der gewählte Sequenzbereich amplifiziert.

Diese Reaktion kann mit einem Zwei-Enzym-System oder mit einem Ein-Enzym-System durchgeführt werden. Beim Zwei-Enzym-System werden dem Reaktionsgemisch eine Reverse Transkriptase und eine DNA-Taq-Polymerase zugefügt, beim Ein-Enzym-System wird die Tth-Polymerase verwendet, die beide Synthesefunktionen je nach Anwesenheit von Mangan- und Magnesiumionen erfüllt.

Dieses Experiment wurde zunächst im Reaktionsgefäß durchgeführt und optimiert (Abb.23) bevor es als On-Chip-Reaktion angewendet wurde (Abb.24, S.69).



**Abb. 23 One Step – RT-PCR**

**links** : Zwei-Enzym-Reaktion mit Enzymmix aus ImPromII-RT + Titanium-Taq bzw. Immolase-Taq  
Als spezifische Primer wurden die Myog-2-Primer eingesetzt, die ein 309bp-PCR-Produkt amplifizieren.  
Zusätzlich wurden für die Umschreibreaktion der RNA zu cDNA Oligo-dT-Primer und Random-Oligos zugegeben (außer bei 2).

M – Marker pUC/MspI

1 – ImPromRT-Puffer + Titanium-Taq

2 - ImPromRT-Puffer + Titanium-Taq (RTohne Oligo-dT-Primer, sondern nur mit Myog-2-Primern)

3 – TitaniumTaq-Puffer + Titanium-Taq

4 - ImPromRT-Puffer + Immolase-Taq

5 - Immolase-Puffer + Immolase-Taq

**rechts** : Ein-Enzym-Reaktion mit Tth DNA-Polymerase

Als Flüssigphasenreaktion sind beide Enzymsysteme anwendbar. Zum Umschreiben der mRNA in cDNA war jedoch immer neben den spezifischen Primern der Einsatz von Oligo-dT-Primern notwendig, da sonst die Reaktion negativ bzw. für die Agarosegelauswertung in nicht zu detektierendem Maßstab ablief (siehe Gelspur 2 in Abb.23).

Für das Zwei-Enzym-System wurden als PCR-Polymerasen die Immolase (Bioline) oder die Titanium-*Taq* (Clontech) mit den entsprechenden Puffern getestet. In Tab.15 sind die Ergebnisse dieses Tests zusammengefasst dargestellt.

**Tab. 15 Verwendete Enzyme und Puffer für One Step – RT-PCR**

Reverse Transkriptase + PCR-Polymerase	Puffer	Ergebnis
Zwei-Enzym-System		*
ImPromII™ - RT (Promega) + Titanium™ <i>Taq</i> DNA Polymerase (Clontech)	ImPromII-RT- Puffer	++
ImPromII™ - RT (Promega) + Titanium™ <i>Taq</i> DNA Polymerase (Clontech)	Titanium- <i>Taq</i> - Puffer	+
ImPromII™ - RT (Promega) + IMMOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE)	ImPromII-RT- Puffer	+++
ImPromII™ - RT (Promega) + IMMOLASE™ DNA Polymerase (BIOLINE)	Titanium- <i>Taq</i> - Puffer	+++
Ein-Enzym-System		
Tth-Polymerase (Promega)	Tth- Puffersystem	+

Die Bewertung erfolgte nach den Signalstärken der Produktbanden in der Agarosegelauswertung :  
 + ++ sehr gut , ++ gut , + ausreichend

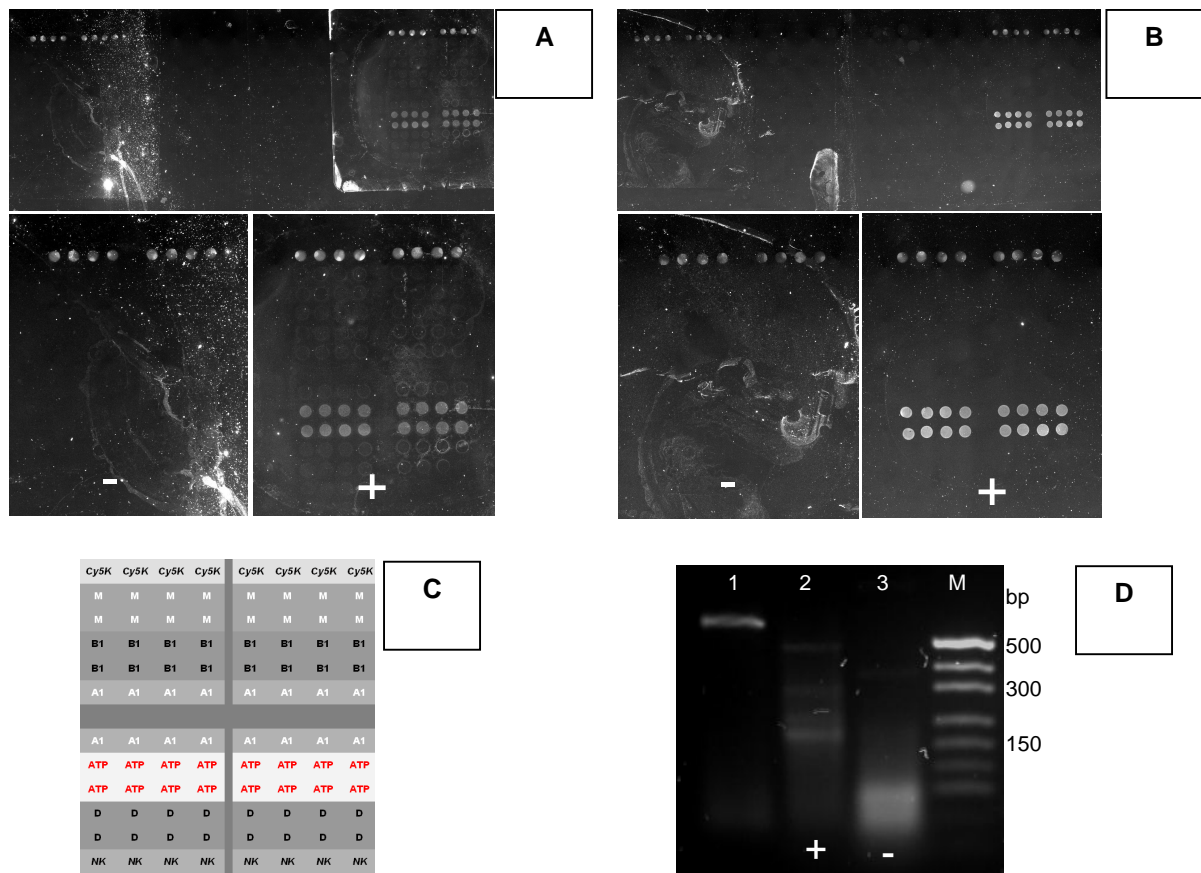
\* Für eine erfolgreiche Reaktion war in jedem Fall die Anwesenheit von Oligo-dT-Primern notwendig.

Nach erfolgreicher Testung der One Step-RT-PCR als Flüssigphasenreaktion wurden die Versuche als On-Chip-Reaktionen durchgeführt.

#### 4.3.1 One Step-RT-PCR on Chip

Die One Step-Reaktion an immobilisierten Primern funktioniert als Ein-Enzym- und als Zwei-Enzym-System. Die Primer wurden wie bei den zuvor beschriebenen On-Chip-PCRs im asymmetrischen Verhältnis eingesetzt. Im Gelelektrophoresebild (Abb.24D) erscheint deshalb auch für das PCR-Produkt nicht die typische Bande wie beim symmetrischen Produkt. Zur Kontrolle einer möglichen Verunreinigung der RNA mit DNA wurde zusätzlich eine Reaktion nur mit der PCR-Polymerase durchgeführt. Im Falle von vorliegenden DNA-Molekülen würde eine Amplifikation stattfinden, da für die Polymerase Matrize zur Verfügung stände. PCR-Polymerasen sind DNA-abhängige Enzyme und benötigen dementsprechend DNA als Matrize. RNA kann mit diesen Enzymen nicht amplifiziert werden. Da diese Kontrollreaktionen in der Chip-Scan- sowie Elektrophoreseauswertung negativ blieben,

können die Signale der One Step-Reaktionen als falschpositiv ausgeschlossen werden, sondern stellen reale positive Reaktionssignale dar.



#### Abb. 24 On Chip – One Step – RT-PCR

Gezeigt ist hier die One Step-RT-PCR des Atp2a2-Genfragmentes an kovalent immobilisierten Primern. Es wurden je zwei Doppelarrays (C) auf einen Chip mit dem TopSpot gespottet. Ein Doppelarray (-) wurde jeweils als Kontrolle ohne Reverse Transkriptase behandelt (linkes Array in A und B).

**A** : One Step – RT-PCR mit Ein-Enzym-System

Die Reverse Transkription und PCR-Synthese wurde mit Tth-Polymerase durchgeführt.

**B** : One Step – RT-PCR mit Zwei-Enzym-System

Als Reverse Transkriptase wurde ImPromII -RT und als PCR-Polymerase Immolase verwendet.

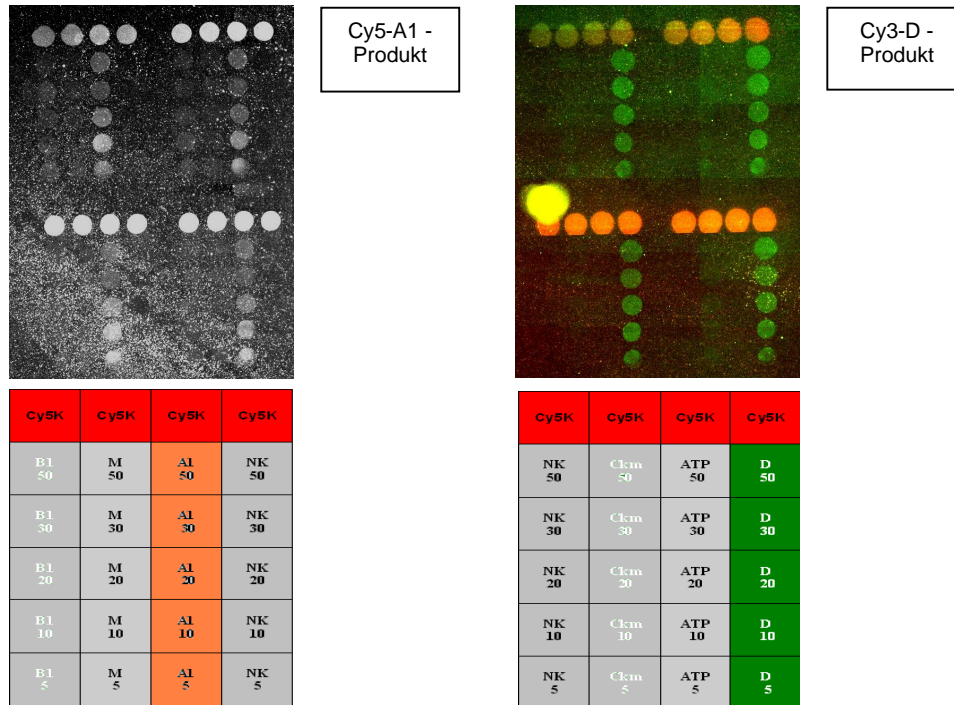
**C** : Arrayschema (Cy5K - Immobilisierungskontrolle, NK - Negativkontroll-Oligonukleotid, ATP - 50µM gespotteter Atp2a2-Primer\_for

**D** : Gelelektrophoresebild der One Step –RT-PCR: 1 – Flüssigphasenreaktion (symmetrisches PCR-Produkt) ; 2 – Überstand der On Chip-Reaktion (B+) mit Reverser Transkriptase und PCR-Polymerase (asymmetrisches PCR-Produkt) ; 3 – Überstand der On Chip-Reaktion (B-) nur mit PCR-Polymerase ; M – Marker pUC/MspI

+ Reaktion mit Reverser Transkriptase und DNA-Polymerase

- Reaktion ohne Reverse Transkriptase, sondern nur mit DNA-Polymerase

Diese Versuche wurden des weiteren an unterschiedlich gekoppelten Primerkonzentrationen durchgeführt (Abb.25). Die Ergebnisse ähneln den On-Chip-PCR-Reaktionen mit cDNA, das heißt, es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Amplifikationseffizienz anhand der Signalintensitäten festgestellt werden.



**Abb. 25 One Step- RT-PCR an unterschiedlichen Primerkonzentrationen**

Es wurden Primerkonzentrationen von 5, 10, 20, 30, 50µM gespottet (4x6 Array, 4fach). Dargestellt sind hier die Reaktionen für das Cy5-Chrna1- sowie Cy3-Chrnd-Genfragment. Die Fluoreszenzbilder wurden am ArrayWorx-Scanner bei 682nm und 595nm aufgenommen.

Bezeichnungen im Arrayschema:

links : B1 – Chrb1, M – Myog ,A1 – Chrna1,

rechts : Ckm – Ckm, ATP – Atp2a2, D – Chrnd

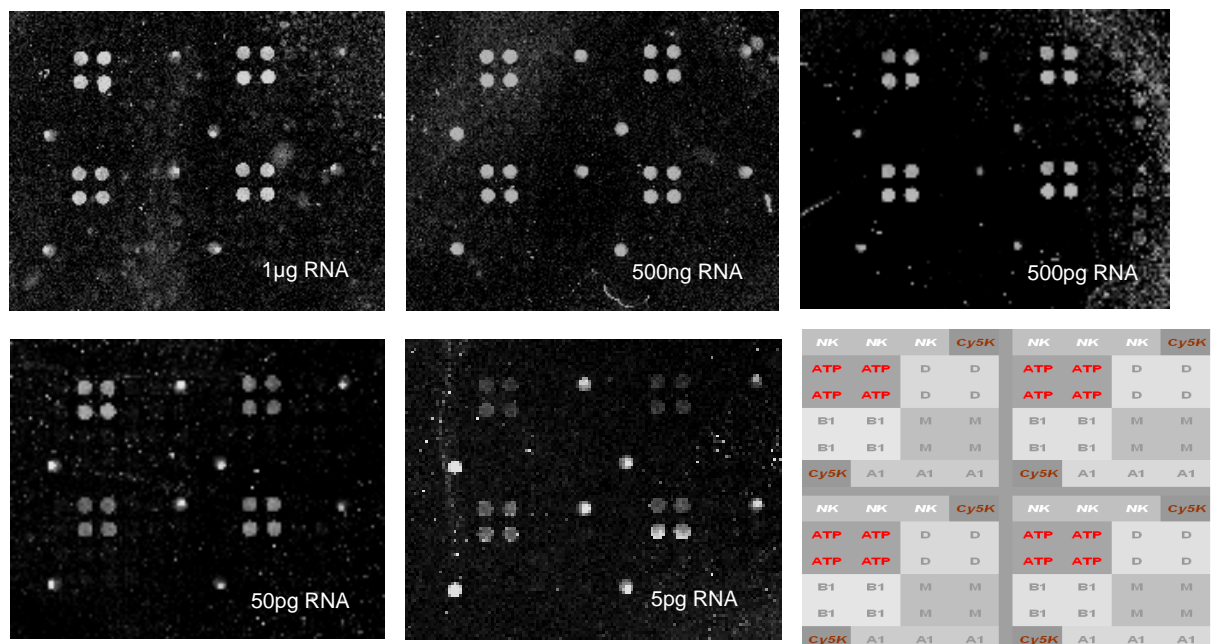
Cy5K – Cy5-Immobilisierungskontrolle (10µM),

NK – Negativkontroll-Oligonukleotid

### 4.3.2 One Step-RT-PCR mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen

Um die Sensitivität der One Step-RT-PCR als Festphasenreaktion zu überprüfen, wurde die RNA-Konzentration als Matrizenmenge reduziert.

In den oben beschriebenen Experimenten wurden immer 1µg RNA<sub>total</sub> eingesetzt. Für den nachfolgend beschriebenen Versuch wurde die RNA-Konzentration über Verdünnungsstufen bis zu 5pg für die Reaktion verringert. Wie die Abb.26 zeigt, ist bis zu 5pg eingesetzte RNA<sub>total</sub> eine Sequenz aus dem Atp2a2-Gen über die On-Chip-Reaktion nachweisbar.



**Abb. 26 On Chip One Step – RT-PCR mit abnehmenden RNA-Konzentrationen**

Als Matrize für die One Step – RT-PCR wurden 5pg bis 1µg RNA<sub>total</sub> eingesetzt. Amplifiziert wurde eine Sequenz aus dem Atp2a2-Gen (siehe Arrayschema unten rechts). Der Scan der Arrays erfolgte unter gleichen Bedingungen bei 682nm am Affymetrix-Scanner bei einer Gain-Einstellung von 60db.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des mRNA-Nachweises über On Chip – PCR

Die gezeigten Ergebnisse dokumentieren, dass mRNA-Sequenzen über RT-PCR an immobilisierten Primern auf einer Chipoberfläche nachweisbar sind. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen den indirekten Weg mit vorhergehender Reverser Transkription der mRNA in cDNA und nachfolgender On-Chip-PCR oder zum anderen den direkten Weg mit Reverser Transkription und PCR integriert in einer Reaktion auf der Chipoberfläche (One Step – RT-PCR).

Wie auch bei der On-Chip-PCR mit *M13*-DNA als Matrize ist es ausreichend, wenn nur ein Primer (forward oder revers) des jeweiligen Primerpaares immobilisiert wird. Als vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn die Spottinglösung 25-30% DMSO enthält. So ergaben die Versuche mit verschiedenen konzentrierten Spottinglösungen, dass eine Primerspotlösung von 10µM ausreichend für eine Kopplung und anschließende Reaktion an den gekoppelten Primern ist .

Als Matrize fungiert cDNA, die ein Gemisch aus einzelsträngigen Kopien der mRNAs einer Probe darstellt.

Die On Chip-PCR mit cDNA als Matrize ist sehr sensitiv, sodass geringe Mengen bis zu einer cDNA-Verdünnung - hergestellt aus max. 2µg RNA<sub>total</sub> - von 1:800 (entspricht ca. 500pg ssDNA) nachgewiesen werden können.

Bei der On-Chip-One-Step-RT-PCR, die RNA als Ausgangsmaterial enthält, sind 5pg RNA<sub>total</sub> schon ausreichend, um detektierbare Signale zu erhalten.

Folgende Optimierungen konnten für die On Chip – Reaktionen ermittelt werden :

Spotten der Primerlösungen mit 25-30% DMSO verbessert die Homogenität der Spots und ermöglicht auch eine geringere Spottingkonzentration (10µM);

Zugabe von 5% DMSO oder 1-1,5M Betain zum Reaktionsmix erhöht die Reaktionseffizienz;

Erhöhen der Magnesiumionenkonzentration bis zu 7mM erhöht ebenfalls die Effektivität ohne die Spezifität der Polymerase zu blockieren;

Verwenden von PCR-Polymerase-Gemischen oder hitzeaktivierbaren PCR-Polymerasen;

zusätzliche Zugabe des gekoppelten Primer als freien Primer im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 gegenüber dem Gegenstrang-Primer.

## 5 Diskussion

### 5.1 On – Chip - PCR mit *M13* –DNA

Alle On-Chip-PCR-Reaktionen mit *M13*-Phagen-DNA wurden mit 25 bis 50 ng Matrize durchgeführt. Diese Menge reicht für den Nachweis der PCR-Produkte auf der Oberfläche aus und kann auch noch reduziert werden. Es konnten DNA-Sequenzen bis zu 7250 bp auf der Oberfläche amplifiziert werden. Diese Größe des PCR-Produktes ist jedoch noch nicht die Obergrenze wie eine weitere Arbeit unserer Arbeitsgruppe anhand der Amplifizierung eines 16,5 kb großen PCR-Produktes zeigen konnte (Nickisch-Rosenegk, Marschan et al. 2004).

#### 5.1.1 Experimente mit verschiedenen Kopplungsmethoden

Die On-Chip-PCR wurde mit zirkulärer DNA des Phagen *M13* als Matrize eingeführt. Dazu wurde jeweils der Vorwärtsprimer affin oder kovalent auf der Oberfläche gekoppelt. Für die affine Kopplung war der Primer an seinem 5'-Ende Biotin-modifiziert. Die On-Chip-PCR wurde auf Avidin-, Neutravidin- und Streptavidin- beschichteten Glasoberflächen durchgeführt. Avidinoberflächen erwiesen sich als ungeeignet. Auf Neutravidinoberflächen konnten positive Ergebnisse erzielt werden, jedoch nicht mit ausreichender Reproduzierbarkeit. Letztendlich konnten nur auf den Streptavidin-Chips PCR-Produkte eindeutig und reproduzierbar identifiziert werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass nur Streptavidin sich gegenüber den Temperaturerhöhungen während einer PCR stabil genug verhält. Zu diesem Ergebnis muss angemerkt werden, dass die Beschichtung der Glas-Chips mit Streptavidin mindestens 2 bis 6 Monate vor Verwendung erfolgte, um ein positives Ergebnis zu erzielen. Frisch beschichtete Chips sind gegenüber den Bedingungen einer PCR noch zu empfindlich, d.h. das Streptavidin ist noch nicht stabil genug. Dennoch kann die affine Kopplung über Streptavidin-Biotin als eine geeignete Methode für anschließende On-Chip-Reaktionen wie der PCR betrachtet werden.

Als kovalente Kopplungsmethoden wurden 5'-aminierte Primer auf Epoxy-Oberflächen (Eppendorf Creative Chips®) gebunden oder mit Isocyano-Silan in Verbindung gebracht und auf silanisierte Oberflächen gespottet. Bei der letztgenannten Methode silanisieren die Primer in Lösung. Die zu bespottende Oberfläche kann auch NaOH-aktiviert sein, jedoch ist sie dann weniger hydrophob als eine silanisierte Oberfläche, sodass die Gefahr des Verlaufs der Spots besteht. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Lösung aus Primer und Isocyano-Silan innerhalb kurzer Zeit polymerisiert und daher die Nadeln oder Düsen des Spotters verstopfen können. Die Versuche hierzu wurden deshalb auch mit Probot-

gespotteten Chips durchgeführt. Die Nadeln des Probots sowie die zuführenden Schläuche haben einen größeren Durchmesser als die der anderen üblichen Spottingroboter.

Im erstgenannten Versuch wurden 5'-aminierte Primer auf Epoxy-beschichtete Glaträger (Eppendorf Creative Chips®) gekoppelt. Diese Chips, die es in der Oligo- und der PCR-Variante gibt, sind für das Spotten von Oligonukleotid-Arrays bzw. von längeren Sequenzen wie PCR-Produkten von der Firma Eppendorf konzipiert worden. Die „Oligo-Chips“ bestehen aus einer dreidimensionalen Epoxy-Beschichtung, die der „PCR-Chips“ ist zweidimensional. Durch die unterschiedliche Dimension der Beschichtung je nach gewünschter Anwendung wird eine sterische Behinderung der gekoppelten Moleküle aufgrund ihrer Größe weitestgehend vermindert. Das heißt, dass die Bindungseffizienz für Oligonukleotide auf dem „Oligo-Chip“ größer ist als auf dem „PCR-Chip“, während auf dem „PCR-Chip“ die Bindungseffizienz für längere Sequenzen durch größere Abstände besser gewährleistet wird. Das erklärt auch, warum bei den On-Chip-PCR-Experimenten die „Oligo-Chips“ bessere Ergebnisse ergaben. Auf ihnen konnten schon bei einer geringen Spottingkonzentration von 5µM die PCR-Spots in ausreichender Fluoreszenzintensität identifiziert werden (Abb.9, S.46). Da die immobilisierte Moleküldichte auf den „Oligo-Chips“ größer ist, führt das zu einem stärkeren Signal nach der PCR-Synthese.

Eine weitere geeignete Immobilisierungsmethode für die On-Chip-PCR ist die EDC-Kopplung. Bei diesem Verfahren werden 5'-phosphorylierte Primer auf einer Silanoberfläche gebunden. Diese auch in anderen Applikationen verwendete Methode ist sehr robust gegenüber thermischen Änderungen und garantiert eine genügend hohe Bindungseffizienz (Andreadis & Chrisey 2000, Adessi et al. 2000).

Für die Experimente zum Nachweis von mRNA wurde die EDC-Kopplung verwendet, da diese Kopplungsmethode sich als leicht handbare sowie zeit- und kostengünstigste der oben beschriebenen Methoden erwies. Gründe, die zum Ausschluss der anderen Methoden führten sind u. a. die lange notwendige Lagerungszeit der Streptavidin-Chips, die Spottinglimitierung bei der Primer-silanisierenden Methode sowie die kostenintensive Beschaffung der Eppendorf Creative Chips®.

Desweiteren wurde in späteren Versuchen zum Nachweis von mRNA über On-Chip-PCR die EDC-Kopplungsmethode durch Zusatz von 25-30% DMSO in der Spottinglösung optimiert, sodass auch die Spottingkonzentration der zu koppelnden Oligonukleotide (Primer) gering gehalten werden kann.

### **5.1.2 Eignung verschiedener PCR-DNA-Polymerasen**

Neben verschiedenen Oberflächen mit entsprechenden Kopplungsmethoden wurde auch die Eignung verschiedener DNA-Polymerasen für die On-Chip-PCR mit fluoreszenz-markierten Primern geprüft. Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Polymerasen erwiesen sich als



tauglich. Jedoch ist die Signalintensität der PCR-Produkte bei Verwendung von hochwertigeren Polymerasen (Titanium, Immolase) bzw. Enzymmischen (Elongase) stärker als bei einfachen Polymerasen (Taq DNA Polymerase LC). Um eine gute und eindeutige Detektierbarkeit garantieren zu können, sollte deshalb auf die Auswahl des Enzyms Wert gelegt werden.

### 5.1.3 Nachweis der On-Chip-PCR-Produkte

Die PCR-Reaktionen auf der Oberfläche wurden durch indirekte und direkte Nachweismethoden überprüft. Bei der indirekten Methode wurden die PCR-Spots durch DNA-Farbstoffe angefärbt. Verwendete DNA-Farbstoffe waren PicoGreen, SybrGreenI und Yoyo1. Bis auf Yoyo1 (Abb.6, S.43) erwies sich dieses Nachweisverfahren – trotz genauer Verdünnungsanweisungen des Herstellers - als ziemlich unzuverlässig, da kein eindeutig sichtbarer Unterschied zwischen den Signalintensitäten von doppelsträngigen PCR-Spots und einzelsträngigen Oligonukleotid-Spots zu erkennen war. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass die empfohlenen Protokolle zum Anfärben von DNA in Lösung und nicht auf Oberflächen angegeben sind. Dementsprechend könnte eine Optimierung des Protokolls zur Verwendung von DNA-Farbstoffen auf Oberflächen zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Als direkte und auch spezifische Nachweismethode wurden während der PCR fluoreszenzmarkierte Primer (Cy5-, Cy3-, TRITC-, FITC- markiert) eingebaut. Der Vorteil dabei ist, dass die synthetisierten PCR-Produkte spezifisch nachgewiesen werden können. Der markierte Primer wird während der PCR-Synthese an der entsprechenden DNA-Matrize zum komplementären DNA-Strang verlängert, der so demgemäß an seinem 5'-Ende die Fluoreszenz-Markierung trägt. Dennoch kann die Detektion von positiven Reaktions-Spots durch verschiedene Parameter beeinflusst sein. Die Signalintensität kann dabei nicht nur infolge geringer Konzentration der gebildeten Produkte oder Ausbleichen der Fluoreszenzmoleküle, sondern auch durch Reaktion der Fluoreszenzmoleküle mit den anderen Reaktionskomponenten schwächer ausfallen. So fällt beim Vergleich des Negativ-Arrays (Thermocycling nur mit Wasser) und PCR-Arrays (Thermocycling mit PCR-Komponenten) in Abb.4 (S.40) ein Unterschied in der Intensität der Cy5-Kontroll-Oligos auf: die Spots beim PCR-Array sind schwächer. Das lässt vermuten, dass in der PCR-Lösung Bestandteile enthalten sind, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff reagieren, ihn inhibieren und somit zu einem abgeschwächten Signal führen.

Die meisten Veröffentlichungen zur On-Chip-PCR beschreiben Nachweise, die über Hybridisierung mit radioaktiven bzw. fluoreszierenden Sonden (Adessi et al. 2000, Strizhkov et al. 2000, Tillib et al. 2001) oder Antikörper-markierten Sonden und nachfolgenden Enzymreaktionen arbeiten (Kohsaka & Carson 1994, Mitterer et al. 2004). Diese Nachweise erfordern zusätzliche arbeits- und materialintensive Schritte, weshalb die in dieser Arbeit

verwendeten fluoreszenz-markierten Primer einen entscheidenden Vorteil zum Nachweis der spezifischen PCR-Produkte bedeuten: das Ergebnis kann unmittelbar nach der Reaktion ausgewertet werden.

#### **5.1.4 Optimale Konzentration des gespotteten Primers bei EDC-Kopplung**

Als Konzentrationsgrenze für EDC-gekoppelte Primer ohne DMSO wurden 10 $\mu$ M ermittelt. Die optimale Primerspotkonzentration liegt bei 50 bis 75 $\mu$ M. Bei diesem Wert ist nach der On-Chip-PCR ein eindeutig positives Signal noch gut detektierbar (Abb.8, S.45).

In späteren Versuchen konnte die EDC-Kopplungsmethode optimiert werden, indem 25-30% DMSO zur Spottinglösung zugegeben wurden. DMSO verringert die Evaporation und somit das Austrocknen der Spots. Dadurch wird die Homogenität der Spots sowie demzufolge des Signals verbessert. Zudem kann so die benötigte Primerkonzentration in der Spottinglösung reduziert werden : statt 50-75 $\mu$ M sind nun 10-30 $\mu$ M ausreichend (Abb.18, S.59).

Dennoch ist unabhängig von der verwendeten Spottinglösung eine Lagerung der gespotteten Chips von 5 Tagen vor der weiteren Verwendung zu empfehlen, da scheinbar erst dann eine genügend hohe Kopplungseffizienz für nachfolgende enzymatische On-Chip-Reaktionen erreicht ist.

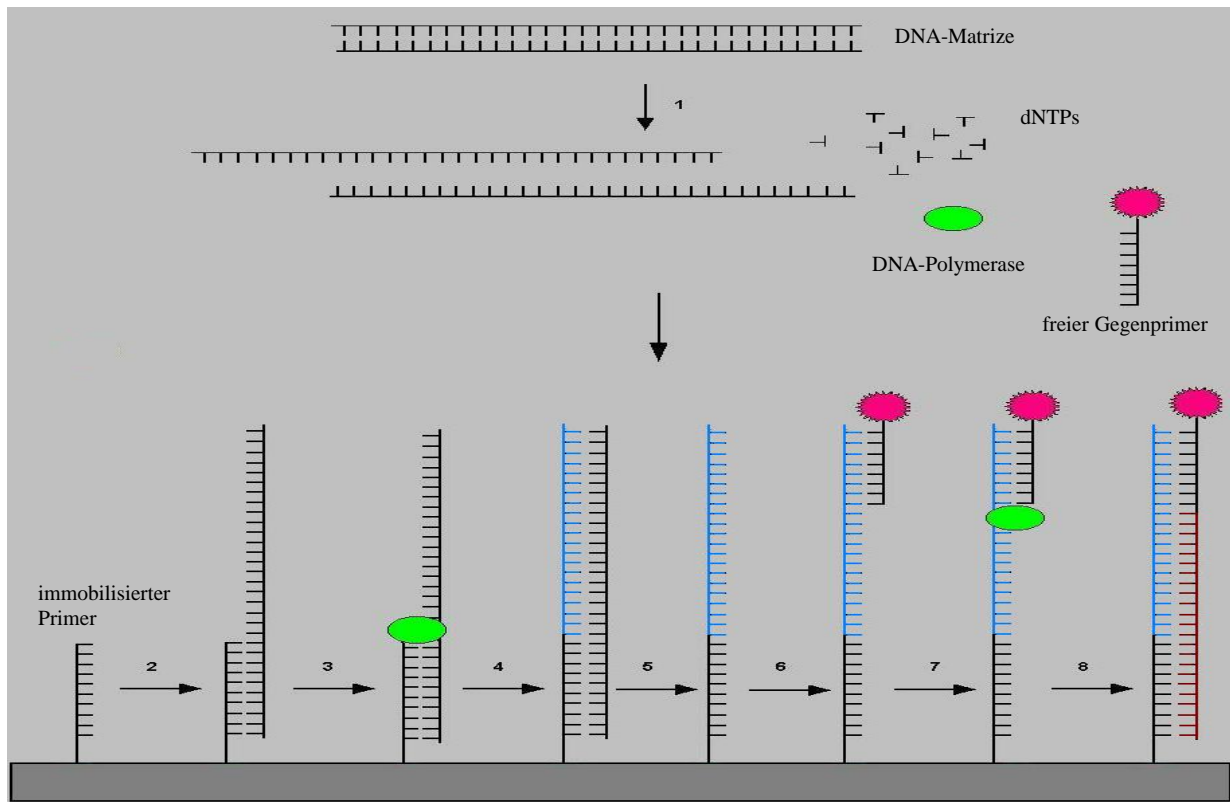
Ein weiterer wichtiger Faktor für eine ausreichende Kopplungseffizienz auf der Oberfläche und ein gut detektierbares Ergebnis nach der Reaktion (d.h. mit geringem Hintergrundsignal) ist die Oberflächenqualität. Die in dieser Arbeit verwendeten silanisierten Glasträger zeigten teilweise bedeutende Unterschiede. Am besten eigneten sich silanisierte Glasträger der Firma Genetix, die aber auch innerhalb einiger Chargen nicht von zufrieden stellender Qualität waren.

## 5.2 Prinzip der On-Chip-PCR mit einem freien Primer

Die On-Chip-PCR mit zirkulärer *M13*-Phagen-DNA konnte mit nur einem frei in Lösung vorliegenden Primer erfolgreich durchgeführt werden, sodass erst der immobilisierte Primer während der PCR verlängert wurde, bevor der Gegenstrang synthetisiert werden konnte (Abb.27). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnis von Kohsaka & Carson (1994), die eine PCR nach dem selben Prinzip mit in Mikrotiterplatten immobilisierten Primern beschreiben. Für eine PCR auf einer Chipoberfläche gibt es von anderen Arbeitsgruppen bisher dazu noch keine Literaturbelege (Nickisch-Rosenegk, Marschan et al. 2004).

Die Abb.27 zeigt eine schematische Darstellung des Reaktionsablaufes einer Festphasen-PCR mit nur einem frei in Lösung vorliegenden Primer, während der Gegenstrang-Primer an der Oberfläche immobilisiert ist. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize durch Hitzeeinwirkung denaturiert und ein Strang lagert sich an die komplementäre immobilisierte Primersequenz an der Oberfläche an. Die Primersequenz wird durch die DNA-Polymerase verlängert. Im nächsten Zyklus löst sich der Matrizenstrang vom neu synthetisierten Strang, der nun ebenso als Matrize fungiert. An ihm bindet ein frei in Lösung vorliegender Gegenstrangprimer, der fluoreszenz-markiert sein kann und zum komplementären Gegenstrang vervollständigt wird. Für die nachfolgenden Zyklen stehen die immobilisierten Stränge an der Oberfläche sowie die frei in Lösung vorliegenden Stränge als Matrizen zur Verfügung. Nach ca. 20 bis 35 Zyklen sind genügend neue Kopien des amplifizierten Fragmentes entstanden und an der Oberfläche immobilisiert.

Neben der Festphasen-Amplifikation kommt es gleichfalls zur Amplifikation in Lösung. Das heißt, der frei in Lösung vorliegende Primer wird wie der immobilisierte Primer zum Einzelstrang verlängert und es entstehen PCR-Produkte in Lösung. Zusätzlich kann der frei synthetisierte Strang während des Denaturierungsschrittes ab dem 2. Zyklus an noch unbelegte immobilisierte Primer hybridisieren und so als zusätzliche Matrize für die Festphasensynthese dienen.



**Abb. 27 Schema der On-Chip-PCR mit einem immobilisierten und einem freien Primer**

Nach dem Denaturieren der Matrizen-DNA (1) hybridisiert ein Matrizenstrang an den komplementären immobilisierten Primer an der Oberfläche (2). Im nachfolgenden Elongationsschritt wird durch die Funktion der DNA-Polymerase der immobilisierte Primer verlängert (3-4). Im nächsten Zyklus wird der Matrizenstrang vom neu synthetisierten Strang (blau) denaturiert (5), sodass nun der Gegenprimer (hier dargestellt mit Fluoreszenzmarkierung) an den immobilisierten Strang hybridisieren (6) und verlängert (7-8) werden kann. Nach Ablauf mehrerer PCR-Zyklen wurden so immobilisierte PCR-Produkte auf der Oberfläche generiert.

Auf der Oberfläche ist nach der Reaktion schließlich nur der am gekoppelten Primer verlängerte Einzelstrang fest immobilisiert, der komplementäre Gegenstrang dagegen ist durch Hybridisierung gebunden. Diese Anordnung ist für nachfolgende Anwendungen von Vorteil. So kann der hybridisierte Einzelstrang denaturiert werden und der immobilisierte Einzelstrang steht für neue Hybridisierungen oder Reaktionen zur Verfügung.

Dieses Prinzip unterscheidet sich von dem bei Adessi et al. (2000) beschriebenen, da dort Forward- und Revers- Primer in einem Spot immobilisiert sind und somit nach der Reaktion beide Einzelstränge fest auf der Oberfläche gebunden sind. Auch kommt es während der PCR nur an einem immobilisierten Primer zu keiner Brückenbildung zwischen Einzelsträngen und gekoppeltem Primer. Dagegen bilden sich während der PCR mit gekoppelten Forward- und Revers- Primern nach den ersten Elongationsschritten solche Brücken aus. Diese Brücken entstehen durch Hybridisierung der verlängerten Einzelstränge mit den noch unverlängerten immobilisierten komplementären Primern (siehe auch Kapitel 2.4).

### 5.3 On – Chip - PCR mit cDNA (On-Chip-RT-PCR)

Das Prinzip der On-Chip-PCR sollte in dieser Arbeit zum Nachweis von mRNA-Transkripten getestet werden. Als Matrize diente nun cDNA statt genomischer oder Plasmid-DNA. Die cDNA wurde in einer getrennten Reaktion durch Reverse Transkription hergestellt. Die zu immobilisierenden Primer sowie die Kontroll-Oligonukleotide wurden per EDC-Methode auf der Oberfläche gekoppelt. Die eingesetzten freien Gegenstrang-Primer enthielten am 5'-Ende eine Fluoreszenz-Markierung, um unmittelbar nach der PCR das Ergebnis detektieren zu können. Optimierungsexperimente ergaben, dass die Amplifizierbarkeit auf der Oberfläche bzw. deren eindeutige Detektion von verschiedenen Parametern beeinflusst wird. Dazu gehören die Auswahl geeigneter Primersequenzen, Magnesiumkonzentration, Einsatz von PCR-additiven Reagenzien (z.B. DMSO, Betain), Konzentration des mRNA-Transkriptes sowie die Oberflächenqualität.

Auf die Bedeutung der Oberflächenqualität wurde schon in den vorigen Kapiteln eingegangen. Je nach Kopplungsmethode muss die Oberfläche entsprechend gut präpariert sein. Für die EDC-Kopplung sind silanisierte Oberflächen Voraussetzung. Die Beschichtung mit Silan ist hinsichtlich der Dichte und Beschaffenheit jedoch auch bei kommerziell erhältlichen Glaträgern von unterschiedlicher Qualität. Die in dieser Arbeit verwendeten silanisierten Glaträger aus eigener Herstellung oder kommerziell (Genetix) erworbenen, genügten im reproduzierbaren Maßstab den Ansprüchen einer qualitativen Auswertung. Die Genetix-Glaträger haben zudem den Vorteil, dass sie zum einen höhere Spotsignale ergeben und zum anderen den unkomplizierten Einsatz für Rnase-freies Arbeiten erlauben.

Bei der Auswahl der Primersequenzen sollte neben den üblichen Eigenschaften (40-60% GC-Gehalt, keine Haarnadel- und Dimer-Bildung) darauf geachtet werden, dass die Schmelztemperaturen sich nicht um mehr als 5°C unterscheiden und Kreuzhybridisierungen mit anderen Sequenzen (ungenügende Spezifität) ausgeschlossen werden können. Für die PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden Gensequenzbereiche ausgesucht, die nahe am 5'-Ende oder am 3'-Ende der Gensequenz bzw. des jeweiligen mRNA-Transkriptes liegen. Die Sequenzausschnitte der folgenden Gene: Atp2a2, Myog, Ckm, Chrna1, Chrb1 und Chrnd konnten erfolgreich auf der Oberfläche amplifiziert werden. Das Ergebnis war dabei unabhängig von der verwendeten Primerkombination, d.h. jeweils das kurze Fragment vom 5'- bzw. 3'- Ende des Genes sowie auch ein langes Fragment waren auf der Oberfläche amplifizierbar. Die gewählten Primer erfüllten somit die Kriterien, die für eine Oberflächenreaktion an immobilisierten Primern erforderlich waren.

Als gespottete Primerkonzentration für die EDC-Kopplung wurden 30 bis 50 µM gewählt. Jedoch zeigten die Versuche mit unterschiedlich konzentriert gespotteten Primern und Zugabe von 25-30% DMSO zur Spottinglösung, dass schon bei 5µM PCR-Produkte auf der Oberfläche detektiert werden können. Die Auswertung der Kontrastwerte zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Primerspottingkonzentrationen von 5 bis 50 µM. Damit

werden die Ergebnisse der On-Chip-PCR mit *M13*-DNA bestätigt. Für dieses Ergebnis gibt es drei mögliche Erklärungen. Erstens, anscheinend liegt schon bei einer geringen Spottingkonzentration eine gesättigte Lösung für die Bindungsstellen auf der Oberfläche vor, sodass die überflüssigen Primermoleküle durch Waschen der Oberfläche nach der Kopplungsreaktion entfernt werden. Zweitens, die Bindungsstellen liegen so eng aneinander, dass schon während der PCR-Reaktion die Bindung bzw. Synthese eng benachbarter Produktes sterisch verhindert wird und somit nicht mehr fluoreszierende Produkte detektierbar sind. Drittens, nach der PCR-Reaktion quenchen sich benachbarte Produkte in ihrer Fluoreszenz.

Im Gegensatz zur On-Chip-PCR mit *M13*-DNA musste zum freien Gegenprimer zusätzlich noch der immobilisierte Primer in geringer Konzentration frei in Lösung dazugegeben werden. Wahrscheinlich werden dadurch erst Flüssigphasen-Reaktionsprodukte synthetisiert, die dann als Enhancer für die Festphasen-Reaktion dienen. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von Tillib et al. (2001), die Versuche mit permanent immobilisierten Primern und einem frei in Lösung vorhandenen Primer durchführten. Wenn ein Primer zusätzlich zum immobilisierten Primer frei in Lösung vorliegt, ist die Amplifikationseffizienz zehnfach höher.

Für die Amplifikation von Genfragmenten wurde in dieser Arbeit ein Primerverhältnis des zusätzlichen freien „immobilisierten“ Primers gegenüber dem freien Gegenstrangprimer von 1:10 bis 1:20 ermittelt.

Statt der zusätzlichen Zugabe des immobilisierten Primers in Lösung kann auch ein Primer verwendet werden, dessen Sequenz etwas außerhalb des 5'-Bereiches des immobilisierten Primers liegt, sodass eine „Nested-PCR“ an der Oberfläche stattfindet.

Ein wesentliches Ergebnis für eine effiziente RT-PCR an der Oberfläche lieferte die Steigerung der Magnesiumionenkonzentration gegenüber den üblichen Konzentrationen in Flüssigphasen-PCRs. Eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration auf 6mM steigert erheblich die Reaktionseffizienz auf der Oberfläche. Magnesiumionen sind wichtige Cofaktoren für eine uneingeschränkte Funktion von DNA-Taq-Polymerasen, die bei PCR-Reaktionen verwendet werden. Erst durch die Anwesenheit dieses Cofaktors kann das Enzym mit der Synthese des Nukleinsäurestranges an der Matrize beginnen. PCR-Reaktionen in Lösung werden gewöhnlich mit einer Magnesiumionenkonzentration von 1,5 - 3 mM durchgeführt. Höhere Konzentrationen können zu unspezifischen Amplifikationsprodukten führen. Jedoch liegen bei einer Reaktion an einer Oberfläche andere Reaktionsbedingungen vor, die durch den eingeschränkten Freiheitsgrad der immobilisierten Moleküle – hier der Primer – nicht so optimal sind wie bei frei in Lösung vorliegenden Reaktionspartnern. Eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration gleicht diesen Nachteil aus, ohne die Spezifität der Polymerase zu beeinflussen.

Eine weitere Verbesserung der Reaktionseffizienz an immobilisierten Primern wird durch Zugabe der PCR-additiven Reagenzien DMSO (5%) oder Betain (1-1,5M) erreicht. Neben ihren Eigenschaften auf die Sekundärstruktur von Nukleinsäuren (Frackman et al. 1998) erhöhen beide Reagenzien die Viskosität der Reaktionslösung, sodass die Moleküle sich mit verminderter Geschwindigkeit bewegen und so z.B. die Polymerase zur Synthese länger an der Matrize gebunden bleibt.

Für die Reaktionen mit cDNA als Matrize wurde diese zuvor über Reverse Transkription aus 1-2µg RNA<sub>total</sub> synthetisiert. On-Chip-PCR-Produkte konnten für eine cDNA-Verdünnung von 1:800 bei gleich bleibenden Scan- und Bildeinstellungen detektiert werden. Das entspricht in diesen Experimenten ca. 500pg einzelsträngiger DNA. Da die verwendete cDNA ein Gemisch aus verschiedenen einzelsträngigen DNA-Molekülen bzw. ein Gemisch aus verschiedenen mRNA-Kopien ist, ist die Menge der eigentlichen Matrize, d.h. des entsprechenden mRNA-Transkriptes noch sehr viel geringer. Wenn empfindlichere Scan- bzw. Bildeinstellungen (z.B. höherer Gainwert am Scanner) für die Auswertung gewählt werden, können auch noch Signale für Reaktionen mit geringeren Matrizenkonzentrationen nachgewiesen werden. Ausgehend von der RNA als Startmaterial ist die benötigte Menge mit 1µg RNA<sub>total</sub> sehr viel geringer als bei den üblichen Mikroarray-Experimenten, die mit mind. 20µg RNA oder zusätzlichen Amplifikationsschritten arbeiten (Wendisch et al. 2001, Dudley et al. 2002, Klur et al. 2003).

Der Nachweis von Genen bzw. deren mRNA-Transkripten ist interessant für die Diskriminierung verschiedener Zelltypen. Eine vergleichende Untersuchung wurde in dieser Arbeit für differenzierte sowie undifferenzierte *C2C12*-Zellen und *L929*-Zellen begonnen. Für *C2C12*-Zellen sind die Gene des Acetylcholinrezeptors charakteristisch und können Aufschluss über den Differenzierungszustand der Zellen geben (Mishina et al. 1986, Evans et al. 1987, Portier et al. 1999). Diese Unterschiede konnten über die Flüssigphasen-RT-PCR bestätigt werden (Tab.13, S.52). Die Genfragmente für die α1- Untereinheit (*Chrna1*) waren sehr gut amplifizierbar, dagegen wurde die β1-Untereinheit (*Chrn1*) leicht schwächer bei cDNA-Matrizen von undifferenzierten *C2C12*-Zellen amplifiziert. Eine mehr auffällige Diskriminierung war bei der Amplifizierung der δ-Untereinheit zu sehen. Dieses Ergebnis ähnelt den Daten der RNA-Blot-Analyse von Evans et al. (1987). Dort konnten die α- und β-Untereinheiten auch schon bei undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Dagegen konnte die δ-Untereinheit (*Chrnd*) erst bei differenzierten Zellen oder nur bei erheblicher Erhöhung der mRNA-Konzentration der undifferenzierten Zellen im Blot detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte einzig die ε-Untereinheit (*Chrne*) nur für die differenzierten *C2C12*-Zellen über RT-PCR nachgewiesen werden, d.h. für die undifferenzierten *C2C12*-Zellen sowie die *L929*-Zellen war kein PCR-Produkt in der Agarosegelauswertung zu identifizieren. Die ε-Untereinheit wird während der Differenzierung gebildet und konnte bei

Northern Blot - Studien erst ab dem 8. Differenzierungstag detektiert werden (Portier et al. 1999). Das RT-PCR-Ergebnis bekräftigt demzufolge diese Aussage.

Weitere untersuchte Gene waren das Myogenin (Myog), die Creatinkinase (Ckm) und eine Atpase (Atp2a2). Von diesen Genen konnte die Atpase bei allen Zelltypen über RT-PCR identifiziert werden. Da für viele Regulationen innerhalb von Zellzyklusprozessen, die Biosynthese verschiedener Zellkomponenten und schließlich auch für die Muskelkontraktion ATP benötigt wird und dieses vor allem durch Atpasen während der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien synthetisiert wird, sind Atpasen wichtige Elemente in Zellen, vor allem in Muskelzellen wie den *C2C12*-Zellen. Ebenso wie die Atpase stellt die Creatinkinase ein wichtiges Enzym zur Bereitstellung von ATP in Muskelzellen – speziell in der gestreiften Muskulatur von Vertebraten – dar. Sie ist für den Transfer des Phosphats vom Creatinphosphat auf ADP verantwortlich. Da das PCR-Produkt aus dem Ckm-Gen nur für die differenzierten *C2C12*-Zellen eindeutig identifiziert werden konnte, liefert das Ckm-Gen einen potentiellen Marker zur Unterscheidung des Differenzierungsgrades sowie des Zelltypes.

Myogenin ist ein muskelspezifischer Transkriptionsfaktor und wird erst während der Differenzierung der Myoblasten gebildet. Das Gen konnte hier jedoch schon bei undifferenzierten Zellen über RT-PCR nachgewiesen werden. Die undifferenzierten Zellen wurden nach 4 Tagen Kultivierungszeit geerntet, zu diesem Zeitpunkt kann eine Differenzierung der Zellen schon begonnen haben. Die Differenzierung der *C2C12*-Zellen ohne Zugabe von Differenzierungsmedium erfolgt normalerweise ab dem 4.-6. Tag. Andres & Walsh (1996) fanden heraus, dass Myogenin sehr früh, d.h. schon während der Proliferation der Myoblasten innerhalb der S- und Zellteilungsphase im Zellzyklus synthetisiert wird und so schon am ersten Differenzierungstag über Immunoblots nachweisbar ist.

Die Ergebnisse der RT-PCR als Flüssigphasenreaktion zeigen, dass der unterschiedliche Differenzierungszustand der *C2C12*-Zellen mit dieser Methode festgestellt werden kann.

Bei den PCRs mit cDNA aus *L929*-Zellen konnten nur das Atpase-Gen und schwach ein *Chrb1*-Gensequenzbereich amplifiziert werden.

Die Sequenzen aus der  $\alpha 3$  (*Chrna3*)- Untereinheit konnten bei keiner Matrize amplifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da die *Chrna3*-Untereinheit nur im neuronalen Rezeptortyp vorkommt, der hier jedoch nicht vorlag.

Bei der Analyse der Zelltypen über On-Chip-PCR wurden die  $\beta 1$ - und die  $\delta$ -Untereinheit untersucht. Das Ergebnis der Flüssigphasenreaktion konnte nicht direkt bestätigt werden. Der Vergleich der Kontrastwerte der Fluoreszenzdaten zeigte lediglich eine leichte Abnahme der Werte von differenzierten, undifferenzierten *C2C12*-Zellen bis zu *L929*-Zellen. Im Fall des PCR-Produktes aus der  $\beta 1$ -Untereinheit ist dieses Ergebnis nach den Daten aus der Flüssigphasenreaktion vorhersehbar, da bei dieser Reaktion auch für alle cDNA-Matrizen



Produkte – wenn auch in unterschiedlichen „Amplifizierbarkeiten“ - nachweisbar waren (siehe Tab.13, S.52). Jedoch steht die Identifizierung der  $\delta$ - Untereinheit für die *L929*-Zellen nach der On-Chip-PCR im klaren Gegensatz zum Ergebnis der Flüssigphasen-PCR, da diese bei der letztgenannten Methode nicht nachgewiesen werden konnte. Bei der On-Chip-PCR dagegen waren eindeutig Signale zu sehen, für die jedoch verminderte Kontrastwerte gegenüber den Signalen der *C2C12*-Zellen ermittelt werden konnten. Die Kontrastwerte unterscheiden sich max. um 10%. Eine Hypothese für dieses Ergebnis wäre, dass die On-Chip-Reaktion sehr viel sensitiver als die Reaktion in Lösung ist und so schon sehr geringe Mengen an mRNA-Transkripten aufgespürt werden können. Jedoch muss angemerkt werden, dass diese On-Chip-Versuche nur einmal durchgeführt wurden. Weitere Experimente zusätzlich unter Einbeziehung anderer Gene, die als potentielle Kandidaten für eine genauere Diskriminierung stehen (z.B. *Chrne*, *Ckm*, *Myog*), müssen sichere Daten erbringen. Dennoch ist die Hypothese nicht auszuschließen, da im Ergebnis einer Real-Time-PCR bis auf das Gen der  $\epsilon$ -Untereinheit alle anderen Gene der Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten bei allen drei cDNA-Matrizen nachgewiesen werden konnten (siehe Anhang). Die Real-Time-PCR-Analyse wurde als Referenzmethode hinzugezogen und an einem Lightcycler-Gerät durchgeführt. Die Methode der Real-Time-PCR bietet sich für quantitative Analysen von Genexpressionsdaten an und wird oft als Ergänzung zur Mikroarray-Technik angewendet (Rasmussen 2001, Livak & Schmittgen 2001, Pfaffl & Hageleit 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von Differential-Genexpressionsmustern bildet die RNA-Fingerprint-Methode über RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed PCR, Welsh et al. 1992), die für verschiedene Zelltypen wie Tumorzellen (Perucho et al. 1995), Muskelzellen (Alfke et al. 1999) oder auch Pflanzenzellen (Menke & Müller-Röber 2001) sowie in Kombination mit cDNA-Arrays (Neumann et al. 2003, Grau et al. 2005) angewendet wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen an, dass die On-Chip-RT-PCR eine weitere optimale Methode für den Nachweis von gering exprimierten Genen bietet.

Nachdem die On-Chip-RT-PCR sich zur Detektion eines mRNA-Transkriptes als geeignet erwies, konnten auch zwei verschiedene mRNA-Transkripte in einer Reaktion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.2.4.5). Um noch mehr Transkripte simultan in einer Reaktion nachweisen zu können, bedarf es jedoch noch einiger Optimierungsschritte. So muss u.a. laut Wilson & Carson (2003) die optimale Konzentration der frei in Lösung vorliegenden Primer, die für das jeweilige spezifische Transkript unterschiedlich sein kann, ermittelt werden. Ursache dafür ist anscheinend die unterschiedlich vorliegende Konzentration der spezifischen mRNAs sowie auch die unterschiedliche Amplifizierbarkeit. „Leicht“ amplifizierbare Sequenzen benötigen eine geringere Primerkonzentration als „schwierige“ Sequenzen. Ein ausgewogenes Primerverhältnis ist deshalb wichtig, um nicht die Synthese der leicht amplifizierbaren Sequenzen zu bevorzugen.

Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Amplifikation von vollständigen cDNA-Sequenzen über RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) bzw. SMART-PCR (Switching Mechanism At 5'end of RNA Template), sodass alle vorliegenden mRNA-Transkripte in einer Reaktion amplifiziert werden. Die Methode der RACE-PCR (Frohmann 1988) wurde inzwischen für verschiedenste Analysen etabliert (Doenecke et al. 1997, Fehr et al. 1999, Funke-Kaiser et al. 2001, Kaebernick et al. 2002, Chen et al. 2002, Schaeffel et al. 2003). Durch Modifizierung der On-Chip-PCR-Technik mit der RACE-PCR-Technik und der Verwendung von fluoreszenz-markierten Universalprimern oder Nukleotiden könnten alle Produkte simultan an immobilisierten Sonden auf einer Oberfläche amplifiziert und gleichzeitig im Arrayformat detektiert werden.

## 5.4 One Step-RT-PCR on Chip

Ein weitere Möglichkeit, Arbeitsschritte einzusparen, bietet die One-Step-RT-PCR. Bei dieser Methode wird innerhalb eines Reaktionsansatzes die mRNA in cDNA umgeschrieben und mit sequenzspezifischen Primern durch eine PCR-Reaktion amplifiziert.

Das Ergebnis der dazu durchgeführten Versuche zeigt, dass diese Reaktion auch als On-Chip-Reaktion an immobilisierten Primern funktioniert. Dabei ist es unerheblich, ob das Zwei-Enzym- oder Ein-Enzym-System verwendet wird. Beide Experimente erbrachten positive Ergebnisse (Abb.24, S.69). Für eine unmittelbare Detektion der RT-PCR-Produkte wurden fluoreszenz-markierte Primer eingesetzt.

Das Prinzip der direkten RT-PCR an Oberflächen wurde schon 1998 von Hamaguchi et al. beschrieben. Jedoch wurden bei ihnen Poly-dT-Oligonukleotide in Polypropylen-Mikrotiterplatten immobilisiert und daran die cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte eine RT-PCR (One Step, Two Step) mit der immobilisierten cDNA als Matrize. Die RT-PCR-Produkte lagen nach der Reaktion in Lösung vor und wurden über Gelelektrophorese nachgewiesen. Die PCR-Produkte sind nach diesem Protokoll nicht immobilisiert.

Ein Experiment mit immobilisierten RT-PCR-Produkten direkt nach der Reaktion wurde von Wilson & Carson (2003) veröffentlicht. Auch sie verwendeten Microwells (NucleoLink™ Strips), in denen die Primer immobilisiert wurden. Der Nachweis der RT-PCR-Produkte erfolgte über eine Hybridisierung mit Biotin-gelabelten Proben und anschließender enzymkonjugierter Farbstoffreaktion (Streptavidin-Alkaline-Phosphatase-Assay). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Detektionsschritt durch Verwenden von fluoreszenz-markierten Primern vereinfacht, das Ergebnis kann sofort anschließend an die Reaktion ausgewertet werden. Die Technologie der One Step-RT-PCR an immobilisierten Primern auf einer Chipoberfläche, d.h einer planaren Oberfläche, wird meines Wissens erstmalig mit dieser Arbeit beschrieben. Sie bildet eine leicht handbare, zeitsparende Methode zur Detektion und Amplifizierung vom mRNA im Mikroarray-Analyseformat. Es konnten mit dieser Methode Gene aus Total-RNA-Proben bis 5pg Startmenge nachgewiesen werden. Diese Nachweismenge kann sicherlich noch reduziert werden, denn wie man in Abb.25 (S.70) sieht, sind die Signale für 5pg noch sehr deutlich zu erkennen. Im Vergleich zur On-Chip-PCR mit cDNA ist die One Step-RT-PCR noch sensitiver.

Wie auch die On-Chip-PCR mit cDNA wird bei dieser Methode weniger Ausgangsmaterial benötigt als bei den herkömmlichen Mikroarray-Hybridisierungen.

Weitere Versuche müssen nun noch klären, wieviel mRNA-Transkripte parallel in einer Reaktion detektiert werden können.

## 6 Zusammenfassung

Abschließend kann festgestellt werden, dass durch diese Arbeit zwei weitere Methoden – erstens die On Chip- RT-PCR mit cDNA als Matrize und zweitens diese Methode als One-Step-Reaktion mit RNA als Matrize - etabliert wurden, um aus geringen RNA-Probenkonzentrationen Gene bzw. deren mRNA-Transkripte nachzuweisen. Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der PCR an immobilisierten Primern auf einer Chipoberfläche. Diese Möglichkeit der exponentiellen Amplifikation ist reproduzierbar und sensitiv. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen von Klur et al. (2003), bei denen die exponentielle Amplifikation über Random-PCR mehr reproduzierbare und sensitivere Ergebnisse für Mikroarraydaten lieferten als die lineare Amplifikation.

Es wurden verschiedene Kopplungsmethoden für die Immobilisierung der Primer mit anschließender PCR auf der Chipoberfläche verwendet. Von den affinen Kopplungen über Biotin-markierte Primer hat sich die Streptavidin-beschichtete Oberfläche als geeignet erwiesen. Die On-Chip-Reaktion an kovalent gebundenen Primern wurde für Epoxy-Oberflächen sowie für EDC-Kopplung auf silanisierten Oberflächen gezeigt. Für die letztgenannte Methode wurde die On-Chip-PCR optimiert, so dass Spottingkonzentrationen der Primer von 5 – 10 $\mu$ M schon ausreichend sind.

Durch Verwenden von fluoreszenz-markierten Primern während der PCR ist eine unmittelbare Auswertung nach der Synthese möglich.

In dieser Arbeit konnte außerdem mit der vorgestellten Methode der simultane Nachweis zweier Gene gezeigt werden. Die Methode kann noch als Multiplex-Analyse ausgebaut werden, um so mehrere Gene gleichzeitig in einem Ansatz nachweisen zu können.

Die Ergebnisse der Versuche mit Matrizen aus unterschiedlichen Zelltypen deuten darauf hin, dass die On-Chip-RT-PCR eine weitere optimale Methode für den Nachweis von gering exprimierten Genen bietet.

**Tab. Übersicht über die PCR-Ergebnisse mit unterschiedlichen Matrizen ermittelt über Standard-PCR, Real-Time-PCR und On-Chip-PCR**

<i>Herkunft der cDNA- Matrize (Zelltyp)</i>	<i>C2C12-Diff</i>			<i>C2C12-undiff</i>			<i>L929</i>			
	<b>Methode</b>	<b>PCR</b>	<b>qPCR</b>	<b>Chip-PCR</b>	<b>PCR</b>	<b>qPCR</b>	<b>Chip-PCR</b>	<b>PCR</b>	<b>qPCR</b>	<b>Chip-PCR</b>
<b>Gen</b>										
<b>Chrna1</b>		++	++	++	++	+	k.A.	-	+	k.A.
<b>Chrna3</b>		-	-	k.A.	-	-	k.A.	-	+	k.A.
<b>Chrb1</b>		++	++	++	+	+	+	+	+	+
<b>Chrnd</b>		+	+	++	+/-	+	+	-	+	+
<b>Chrne</b>		+	+	k.A.	-	-	k.A.	-	-	k.A.
<b>Ckm</b>		++	++	++	+/-	+	k.A.	-	+	k.A.
<b>Myog</b>		++	++	++	+	+	k.A.	-	+	k.A.
<b>Atp2a2</b>		++	++	++	++	++	k.A.	++	++	k.A.

Amplifizierbarkeit: ++ sehr gut , + gut , +/- schwach , - kein Signal

k.A. = keine Angabe (noch nicht getestet)

verwendete Methoden : PCR – Standard-PCR , qPCR – Real-Time-PCR (Lightcycler\*) , Chip-PCR

\*Die Real-Time-RT-PCR erfolgte mit einem LightCycler (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland), der schnelles Thermocycling mit der Online SYBR Green I-Fluoreszenzdetektion der PCR-Produkte kombiniert.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APTES	3-Aminopropyl-trietoxysilan
ag	Attogramm (atto = $10^{-18}$ )
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA (copy DNA)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA = doppelsträngige DNA
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAM	Fluoreszenzfarbstoff: Fluorescein-Addition-Monomer
FITC	Fluoreszenzfarbstoff: Fluorescein-isothiocyanat
fg	Femtogramm (femto = $10^{-15}$ )
kb	Kilobasen
LSM	Laserscanmikroskop
min	Minute
$\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Mikrogramm / Mikroliter (mikro = $10^{-6}$ )
ng	Nanogramm (nano = $10^{-9}$ )
pg	Picogramm (pico = $10^{-12}$ )
PCR	Polymerasekettenreaktion (eng.: Polymerase Chain Reaction)
r	ribosomal
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	Ribosomale RNA
RNA <sub>total</sub> (total RNA)	Gesamt-RNA einer Zelle
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
SSC	Saline-Sodium-Citrate-Puffer
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	single stranded DNA = einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer

TRITC  
u Fluoreszenzfarbstoff : Tetratmethylnhodamin-isothiocyanat  
unit (Enzymeinheit)

### Bezeichnung der Gene

Chrna1  $\alpha$ -Unterheit des Acetylcholinrezeptorgenes  
Chrb1  $\beta$ -Unterheit des Acetylcholinrezeptorgenes  
Chrnd  $\delta$ -Unterheit des Acetylcholinrezeptorgenes  
Chrne  $\epsilon$ -Unterheit des Acetylcholinrezeptorgenes  
Chrng  $\gamma$ -Unterheit des Acetylcholinrezeptorgenes  
Ckm Creatinkinase-Gen  
Myog Myogenin-Gen  
Atp2a2 ATPase-Gen ( $\text{Ca}^{2+}$  transportierend, slow twitch 2)  
*M13-DNA (M13mp18)* Plasmid-DNA des Bakteriophagen M13

### Zelllinien

*C2C12* Maus-Myoblasten (Muskelzellen)  
*L929* Maus-Fibroblasten

## Literaturverzeichnis

- Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, Kawashima E. (2000). "Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms." Nucleic Acid Research **28**(20): e87.
- Alfke H, Stumm G, Schnieder I, Klose KJ, Schlegel (1999). " Differential gene expression of vascular smooth muscle cells. Detection by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction." Vasa.**28**(3):164-8.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." Nature **403**(6769):503-11.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12):5350-4.
- Andreadis JD. and Chrisey LA (2000). "Use of immobilized PCR primers to generate covalently immobilized DNAs for in vitro transcription/translation reactions." Nucleic Acids Res **28**(2):e5.
- Andres V and Walsh K (1996). "Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis." J Cell Biol **132**(4):657-66.
- Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R Jr, Milanovich F, Nasarabadi S, Nelson W, Richards J, Stratton P (1998). "Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument." Clinical Chemistry **44**(10): 2191-2194.
- Bier FF, Gajovic-Eichelmann N, Hölzel R (2002). "Oriented immobilization of single DNA molecules as a nanostructuring tool." in: Fritsche, W. (ed), DNA-based Molecular Construction AIP Conference Proceedings **640**: 51-59.
- Bier FF, Kleinjung F, Schmidt PM, Scheller FW (2002). "Determination of the turnover number of the restriction endonuclease EcoRI using evanescent wave technology." Anal. Bioanal. Biochem. **372**(2): 308-313.
- Bilitewski U, Bier FF, Brandenburg A, (1998). "Immunobiosensors based on grating couplers", in Rogers, K.R. and Mulchandani, A, eds: Affinity Biosensors-Techniques and Protocols, Human Press, Totowa, p.121-134
- Bittner M and Meltzer P (2000). "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." Nature **406**(6795):536-40.



- Boireau W, Bombard S, Sari MA, Pompon D (2002). "Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes." Biotechnol Bioeng **77**(2):225-31.
- Braun E (1998). "DNA Used To Create Self Assembling Conducting Wire: Breakthrough Will Lead To Next Leap In Emerging Nanoelectronics" Source: American Society For Technion, Israel Institute Of Technology
- Braun E, Eichen Y, Sivan U, Ben-Yoseph G (1998). "DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire." Nature **391**(6669):775-8.
- Braun E (1999). "Physical Biology or Physical gaze of biological systems" Notes for « Basic Ideas of Modern Physics », Hebrew University
- Burkin DJ, Kim JE, Gu M, Kaufman SJ (2000). "Laminin and alpha7beta1 integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors." J Cell Sci **113** ( Pt 16): 2877-86.
- Cheng J, Shoffner MA, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P (1995). "Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips." Nucleic Acids Res **24**(2):380-5.
- Cheng J, Shoffner MA, Mitchelson KR, Kricka LJ, Wilding P (1996). "Analysis of ligase chain reaction products amplified in a silicon-glass chip using capillary electrophoresis." J Chromatogr A **732**(1): 151-8.
- Cheng J, Waters LC, Fortina P, Hvichia G, Jacobson SC, Ramsey JM, Kricka LJ, Wilding P (1998). "Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction and capillary electrophoretic analysis of human DNA on microchip-based devices." Anal Biochem. **257**(2):101-6.
- Cheng J, Sheldon EL, Wu L, Uribe A, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O'Connell JP (1998). "Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from E. coli in microfabricated bioelectronic chips." Nature Biotechnology **16**: 541-.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G (1999). "Making and reading microarrays." Nature Genet **21**(Suppl): 15-19.
- Chiem NH and Harrison DJ (1998). "Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination." Clin Chem **44**(3): 591-8.
- Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W (1997). "DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA." BioTechniques **22**: 550-553.
- Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ (1997). "Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins." J Chromatogr A **781**(1-2): 271-6.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997). "Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale." Science.**278**:680-686.
- Doenecke A, Winnacker EL, Hallek M (1997). "Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines." Leukemia.**11**(10):1787-1792.

- Dubiley S, Kirillov E, Mirzabekov A (1999). "Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers." Nucleic Acids Research **27**: e19.
- Dudley AM, Aach J, Steffen MA, Church GM (2002). "Measuring absolute expression with microarrays with a calibrated reference sample and an extended signal intensity range." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7554-9.
- Duga S, Solda G, Asselta R, Bonati MT, Dalpra L, Malcovati M, Tenchini ML (2001). "Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms." J Hum Genet **46**(11):640-8.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999). "Expression profiling using cDNA microarrays." Nature Genet **21**(Suppl): 10-14.
- Dunn WC, Jacobson SC, Waters LC, Kroutchinina N, Khandurina J, Foote RS, Justice MJ, Stubbs LJ, Ramsey JM (2000). "PCR amplification and analysis of simple sequence length polymorphisms in mouse DNA using a single microchip device." Anal Biochem **277**(1): 157-60.
- Erdogan F, Kirchner R, Mann W, Ropers HH, Nuber UA (2001). "Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays." Nucleic Acids Research **29**: e36.
- Evans S, Goldman D, Heinemann S, Patrick J (1987). "Muscle Acetylcholine Receptor Biosynthesis - Regulation by Transkript Availability." J Biol Chem **10**: 4911-16.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991). "Light-directed, spatially adressable parallel chemical synthesis." Science **251**: 767-773.
- Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D (1998). "Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR." Promega Notes 65: 27
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988). "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer." Proc Natl Acad Sci U S A. **85**(23):8998-9002.
- Fu DJ, Tang K, Braun A, Reuter D, Darnhofer-Demar B, Little DP, O'Donnell MJ, Cantor CR, Koster H (1998). "Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry." Nature Biotechnology **16**: 381-384.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999). "Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**: 531-7.
- Grau M, Sole X, Obrador A, Tarafa G, Vendrell E, Valls J, Moreno V, Peinado MA, Capella G (2005). "Validation of RNA Arbitrarily Primed PCR Probes Hybridized to Glass cDNA Microarrays: Application to the Analysis of Limited Samples." Clin Chem. **51**(1):93-101.

- Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, Zacharewski TR (2001). "Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones." Nucleic Acids Research **29**(2): 582-588.
- Hamaguchi Y, Aso Y, Shimada H, Mitsuhashi M (1998). "Direct reverse transcription-PCR on oligo(dT)-immobilized polypropylene microplates after capturing total mRNA from crude cell lysates." Clin Chem **44**(11): 2256-63.
- Heckmann JM, Morrison KE, Emeryk-Szajewska B, Strugalska H, Bergoffen J, Willcox N, Newsom-Davis J (1996). "Human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA1) association with autoimmune myasthenia gravis in black, mixed-ancestry and Caucasian subjects." J Autoimmun **9**(2):175-80.
- Heise C (2004). "Strukturierte Immobilisierungen auf Oberflächen für Biochip-Anwendungen." Dissertation Math.-Nat. Fakultät, Univ. Potsdam .
- Holzel R, Gajovic-Eichelmann N, Bier FF (2003). "Oriented and vectorial immobilization of linear m13 dsDNA between interdigitated electrodes - towards single molecule DNA nanostructures." Biosens. Bioelectron **18**: 555-564.
- Huber M, Losert D, Hiller R, Harwanegg C, Mueller MW, Schmidt WM (2001). "Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays." Analytical Biochemistry **299**: 24-30.
- Huber M, Mundlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempfer CB, Mueller MW, Schmidt WM (2002). "Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays." Analytical Biochemistry **303**: 25-33.
- Ibrahim MS, Lofts RS, Jahrling PB, Henchal EA, Weedn VW, Northrup MA, Belgrader P (1998). "Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA." Anal. Chem. **70**: 2013-2017.
- Ikonen E, Manninen T, Peltonen L, Syvanen AC (1992). "Quantitative determination of rare mRNA species by PCR and solid-phase minisequencing." PCR Methods Appl **1**(4): 234-40.
- Iscove NN, Barbara M, Gu M, Gibson M, Modi C, Winegarden N (2002). "Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA." Nature Biotech **20**: 940-943
- Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L (2004). "Nanotechnology and biosensors." Biotechnol Adv **22**(7): 505-18.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969). "RNA-DNA hybrids at the cytological level." Nature **223**(206): 582-7.
- Jones DS, Schofield JP, Vaudin M (1991). "Fluorescent and radioactive solid phase dideoxy sequencing of pcr products in microtitre plates." DNA Seq **1**(4): 279-83.
- Kaebnick M, Dittmann E, Borner T, Neilan BA (2002). "Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide." Appl Environ Microbiol. **68**(2):449-55.

- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979). "Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure." Nucleic Acids Res **7**(6): 1541-52.
- Kaneoka H, Lee DR, Hsu KC, Sharp GC, Hoffman RW (1991). "Solid-phase direct DNA sequencing of allele-specific polymerase chain reaction-amplified HLA-DR genes." Biotechniques **10**(1): 30, 32, 34.
- Kleinjung F (1998). "Sensorik und Kinetik biochemischer Nukleinsäure-Wechselwirkungen an Oberflächen." Dissertation Math.-Nat. Fakultät, Univ. Potsdam .
- Klur S, Toy K, Williams MP, Certa U (2004). "Evaluation of procedures for amplification of small-size samples for hybridization on microarrays." Genomics **83**: 508-517.
- Kohsaka H and Carson DA (1994). "Solid-phase polymerase chain reaction." Journal of Clinical Laboratory Analysis **8**: 452-455.
- Kopp MU, Mello AJ, Manz A (1998). "Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip." Science **280**(5366): 1046-8.
- Koster H, Tang K, Fu DJ, Braun A, van den Boom D, Smith CL, Cotter RJ, Cantor CR (1996). "A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry." Nature Biotechnology **14**: 1123-1128.
- Koutny LB, Schmalzing D, Taylor TA, Fuchs M (1996). "Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol." Anal Chem **68**(1): 18-22.
- Kricka LJ (2001). "Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century." Clinica Chimica Acta **307**: 219-223.
- Kukolka F and Niemeyer CM (2004). "Related Synthesis of fluorescent oligonucleotide--EYFP conjugate: towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae." Org Biomol Chem **2**(15): 2203-6.
- Kumar A, Larsson O, Parodi D, Liang Z (2000). "Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization." Nucleic acids research **28**(14): e71.
- Kurg A, Tonisson N, Georgiou I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A (2000). "Arrayed primer extension: Solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology." Genetic Testing **4**: 1-7.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000). "Gene-expression profile of the ageing brain in mice." Nature Genet **25**: 294-297.
- Lee JK, Bussey KJ, Gwadry FG, Reinhold W, Riddick G, Pelletier SL, Nishizuka S, Szakacs G, Annereau JP, Shankavaram U, Lababidi S, Smith LH, Gottesman MM, Weinstein JN (2003). "Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells." Genome Biology **4**: R82
- Lipshutz R (2000). "Applications of high-density oligonucleotide arrays." Novartis Foundation Symposium **229**: 84-93.

- Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP (1995). "Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity." BioTechniques **19**(3): 442-447.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." Nature Genet **21**(Suppl): 20-24.
- Little JW, Lehman IR, Kaiser AD (1967). "An exonuclease induced by bacteriophage lambda. I. Preparation of the crystalline enzyme." J Biol Chem **242**(4): 672-8
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). "Analysis of Relative Gene Expressions Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) Method." Method Methods **25**(4): 402-408.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996). "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." Nature Biotechnology **14**: 1675-1680.  
<http://www.affymetrix.com>
- Lockhardt DJ and Winzeler EA (2000). "Genomics, gene expression and DNA arrays." Nature **405**: 827-836.
- Mangru, S. D. and D. J. Harrison. (1998). "Chemiluminescence detection in integrated post-separation reactors for microchip-based capillary electrophoresis and affinity electrophoresis." Electrophoresis **19**(13): 2301-7.
- Martinou JC, Falls DL, Fischbach GD, Merlie JP (1991). "Acetylcholine receptor-inducing activity stimulates expression of the epsilon-subunit gene of the muscle acetylcholine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17):7669-73.
- McClintick JN, Jerome RE, Nicholson CR, Crabb DW, Edenberg HJ (2003). "Reproducibility of oligonucleotide arrays using small samples." BMC Genomics **4**: 4
- McGall G, Labadie J, Brock P, Wallraff G, Nguyen T, Hinsberg W (1996). "Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **93**: 13555-13560.
- McGall, G., A. D. Barone, et al. (1997). "The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates." Journal of the American Chemical Society **119**(22): 5081-5090.
- McGall G and Fidanza JA (2000). "High-Density Oligonucleotide Probe Arrays." Proc of SPIE **3926**: 106-110.
- Menke U and Mueller-Roeber B (2001). "RNA Fingerprinting of specific plant cell types: Adaption to plants and optimization of RNA Arbitrarily Primed PCR (RAP-PCR)." Plant Molecul Biol Reporter **19**: 33-48.
- Mills JC, Roth KA, Cagan RL, Gordon JI (2001). "DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell." Nature Cell Biol **3**: E177-E178

- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B (1986). "Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor." Nature **321**: 406-411
- Mitra RD and Church GM (1999). "In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules." Nucleic acids research **24**(24): e34.
- Mitterer G, Huber M, Leidinger E, Kirisits C, Lubitz W, Mueller MW, Schmidt WM (2004). "Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences." Journal of Clinical Microbiology **42**(3): 1048-1057.
- Moran JL, Li Y, Hill AA, Mounts WM, Miller CP (2002). "Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling." Physiol Genomics **10**(2): 103-11.
- Neumann E, Lechner S, Tarner IH, Grifka J, Gay S, Ruschoff J, Renke B, Scholmerich J, Kullmann F, Muller-Ladner U (2003). "Evaluation of differentially expressed genes by a combination of cDNA array and RAP-PCR using the AtlasImage 2.0 software." J Autoimmun. **21**(2):161-166.
- Nickisch-Rosenegk M, Marschan X, Andresen D, Abraham A, Heise C, Bier FF (2005). "On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces" Biosens Bioelectron **20**(8): 1491-1498
- Niemeyer CM, Sano T, Smith CL, Cantor CR (1994). "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates." Nucleic Acids Research **22**: 5530-5539.
- Niemeyer CM, Boldt L, Ceyhan B, Blohm D. (1999). "Evaluation of single-stranded nucleic acids as carriers in the DNA-directed assembly of macromolecules." Journal of Biomolecular Structure & Dynamics **17**: 527-538.
- Niemeyer CM, Adler M, Pignataro B, Lenhart S, Gao S, Chi L, Fuchs H, Blohm D (1999). "Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR." Nucleic Acids Research **27**(23): 4553-4561.
- Niemeyer CM (2001). "Semi-synthetic nucleic acid-protein conjugates: applications in life sciences and nanobiotechnology." J Biotechnol **82**(1):47-66. Review.
- Niemeyer CM, Adler M, Gao S, Chi L (2002). "Supramolecular DNA-streptavidin nanocircles with a covalently attached oligonucleotide moiety." J Biomol Struct Dyn **20**(2):223-30.
- Niemeyer CM, Ceyhan B, Noyong M, Simon U (2003). "Bifunctional DNA-gold nanoparticle conjugates as building blocks for the self-assembly of cross-linked particle layers." Biochem Biophys Res Commun **311**(4):995-9.
- Niemeyer CM, Wacker R, Adler M (2003). "Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates." Nucleic Acids Research **31**(16): e90.

- Nikiforov TT and Rogers YH (1995). "The use of 96-well polystyrene plates for DNA hybridization-based arrays: an evaluation of different approaches to oligonucleotide immobilization." Anal Biochem **227**(1): 201-209
- Obeid PJ, Christopoulos TK, Crabtree HJ, Backhouse CJ (2003). "Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection." Analytical Chemistry **75**: 288-295.
- Ohara R, Tanaka A, Ohara O (1997). "Automated fluorescent DNA sequencing by a simplified solid-phase chemical sequencing method." Biotechniques **22**(4): 653-6.
- Oroskar AA, Rasmussen SE, Rasmussen HN, Rasmussen SR, Sullivan BM, Johansson A (1996). "Detection of immobilized amplicons by ELISA-like techniques." Clinical Chemistry **42**(9): 1547-1555.
- Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvanen AC (1997). "Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays." Genome Research **7**: 606-614.
- Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen AC (2000). "A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays." Genome Research **10**: 1031-1042.
- Perucho M, Welsh J, Peinado MA, Ionov Y, McClelland M (1995). "Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: applications in cancer research." Methods Enzymol. **254**:275-90.
- Pfaffl MW and Hageleit M (2001). "Validation of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR." Biotechnology Letters **23**: 275-282.
- Pirrung MC, Fallon L, Zhu J, Lee YR (2001). "Photochemically removable silvyl protecting groups." J. Am. Chem. Soc. **123**: 3638-3643.
- Portier GL, Benders AG, Oosterhof A, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH (1999). "Differentiation markers of mouse C2C12 and rat L6 myogenic cell lines and the effect of the differentiation medium." In Vitro Cell. Dev. Biol./Animal **35**: 219-227.
- Quackenbush J (2002). "Microarray data normalization and transformation." Nature Genet **32** (Suppl): 496-501.Review.
- Rasmussen SR, Rasmussen HB, Larsen MR, Hoff-Jorgensen R, Cano RJ (1994). "Combined polymerase chain reaction - hybridization microplate assay used to detect bovine leukemia virus and Salmonella." Clinical Chemistry **40**(2): 200-205.
- Rasmussen R (2001). "Quantification on the LightCycler." in Meuer, S., Wittwer, C. Nakagawara, K., eds.: Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, p. 21-34.
- Rempel N, Heyers S, Engels H, Slegers E, Steinlein OK (1998). "The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta2- and alpha3-subunit genes (CHRNA2 and CHRNA3)." Hum Genet **103**(6):645-53.

- Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L (1998). "High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry." Nature Biotechnology **16**: 1347-1351.
- Rolfs A and Weber I (1994). "Fully-automated, nonradioactive solid-phase sequencing of genomic DNA obtained from PCR." Biotechniques **17**(4): 782-7.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA (1989). "Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6230-6234.
- Sambrook J, Russell DW (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". (Third Edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanes JR and JW Lichtman. (1999). "Development of the vertebrate neuromuscular junction." Annu Rev Neurosci **22**: 389-442. Review.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**: 467-470.  
<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>
- Shapiro MH, Leuther KK, Nguyen A, Scott M, Jones KW (2001). "SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing." Genome Res **11**(11): 1926-34.
- Schmidt PM, Matthes E, Scheller FW, Bienert M, Lehmann C, Ehrlich A, Bier FF (2002). "Real-time determination of telomerase activity in cell extracts using an optical sensor." Biol Chem **383**(10): 1659-1666.
- Schmidt PM, Lehmann C, Matthes E, Bier FF (2002). "Detection of activity of telomerase in tumor cells using fibre optical sensors." Biosens Bioelectron **17**(11-12): 1881-1087.
- Shoffner MA, Cheng J, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P (1996). "Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR." Nucleic Acids Res **24**(2): 375-9.
- Shumaker JM, Metspalu A, Caskey CT (1996). "Mutation detection by solid phase primer extension." Human Mutation **7**: 346-354.
- Song MI, Iwata K, Yamada M, Yokoyama K, Takeuchi T, Tamiya E, Karube I (1994). "Multisample analysis using an array of microreactors for an alternating-current field-enhanced latex immunoassay." Analytical Chemistry **66**(6): 778-781.
- Southern EM and Elder JK (1992). "Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models." Genomics **13**: 1008-1017.
- Southern EM, Case-Green SC, Elder JK, Johnson M, Mir KU, Wang L, Williams JC (1994). "Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids." Nucleic Acids Research **22**(8): 1368-1373.
- Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999). "Molecular interactions on microarrays." Nature Genet **21**(Suppl): 5-9.



- Stahl DA and Amann R (1991). "Development and application of nucleic acid probes." In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds.: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, p.205–248.
- Stahl S, Hultman T, Olsson A, Moks T, Uhlen M (1988). "Solid phase DNA sequencing using the biotin-avidin system." Nucleic Acids Res **16**(7): 3025-38.
- Stirewalt DL, Pogosova-Agadjanyan EL, Khalid N, Hare DR, Ladne PA, Sala-Torra O, Zhao LP, Radich JP (2004). "Single-stranded linear amplification protocol results in reproducible and reliable microarray data from nanogram amounts of starting RNA." Genomics **83**: 321-331.
- Strizhkov BN, Drobyshev AL, Mikhailovich VM, Mirzabekov AD (2000). "PCR Amplification on a Microarray of Gel-Immobilized Oligonucleotides: Detection of Bacterial Toxin- and Drug-Resistant Genes and Their Mutations." BioTechniques **29**: 844-854.
- Tang K, Fu DJ, Julien D, Braun A, Cantor CR, Koster H (1999). "Chip-based genotyping by mass spectrometry." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 10016-10020.
- Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD (2001). "Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip." Analytical Biochemistry **292**: 155-160.
- Violeta GT and Swaisgood HE (1982). "Analysis and optimization of methods using water-soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass." Bioengineering **24**: 1069-1080.
- Waters LC, Jacobson SC, Krutchinina N, Khandurina J, Foote RS, Ramsey JM (1998). "Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification and electrophoretic sizing." Anal. Chem. **70**: 158-162.
- Waters LC, Jacobson SC, Krutchinina N, Khandurina J, Foote RS, Ramsey JM (1998). "Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip." Anal. Chem. **70**: 5172-5176.
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M (1992). "Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA." Nucleic Acids Res.**20**(19):4965-70.
- Wendisch VF, Zimmer DP, Khodursky A, Peter B, Cozzarelli N, Kustu S (2001). "Isolation of Escherichia coli mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays." Anal Biochem **290**(2): 205-13.
- Wilding P, Kricka LJ, Cheng J, Hvichia G, Shoffner MA, Fortina P (1998). "Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers." Anal Biochem **257**(2): 95-100.
- Wilson T and Carson J (2003). "Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens." Dis Aquat Organ **54**(2): 127-34.
- Yan H, Park SH, Finkelstein G, Reif JH, LaBean TH (2003). "DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires." Science **301**(5641):1882-4.

- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002). "Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation." Nucleic Acids Research **30**(4): e15.
- Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, Stack R, Becker JW, Montgomery JR, Vainer M, Johnston R (2001). "An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detection changes in global mRNA expression." Nucleic Acids Research **29**(8): e41.
- Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC (2002). "Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays." Nucleic Acids Research **30**(10): e48.
- Zhang Y, Price BD, Tetradis S, Chakrabarti S, Maulik G, Makrigiorgos GM (2001). "Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays." Nucleic Acids Research **29**(13): e66.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die durch ihre Hilfe und Motivation und Freundschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Frank Bier für die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu können sowie die vielen Ratschläge und Zusprüche.

Dr. Markus von Nickisch-Roseneck für seine Unterstützung und, dass er mich an dieses Institut geholt hat.

Dr. Eva Ehrentreich-Förster für ihre muntere Art, Probleme und Zweifel zu zerstreuen.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des IBMT „Bambi-Bridge“ :

Alexander, Alexandra, Andrea, Andreas, Bettina, Carsten, Christian, Dennie, Dirk, Edda, Heiko, Hiwis, Hr. Franke, Mohamad, Ines, Jenny, Jörg, Kathi, Michaela, Mandy, Nenad, Peter, Ralph, Rothin, Susanne, Thomas, Till, Tobias sowie auch den Elephanten.

Mein besonderer Dank gilt dabei Mandy für ihre geduldige Hilfe bei der Zellkultur und allen anderen Laborarbeiten sowie Edda und Michaela für ihren unermüdlichen Einsatz bei all meinen Spottingwünschen, und generell für die große Hilfsbereitschaft aller IBMTler.

Das IBMT-Team mit seinem interdisziplinären Charakter und vor allem der netten Atmosphäre hat mir das Paddeln im für mich unbekanntem Gewässer der Biotechnologie sehr erleichtert.

Danke Jenny für die Salatpausen (ja manche Gewohnheiten nimmt man immer mit) und die vielen lustigen intra- und interfachspezifischen Episoden, die den Forscheralltag auflockerten. Und nicht zu vergessen: unsere großartige Kombination zu „Hirnschmalz“ ( Du das Hirn, Ich das Schmalz :-)) - besonders beim „Projekt Buchner“ - hab ich niemals missen wollen.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Morgenstern und Dr. Pilarcyk vom AMBT Berlin für die Kultivierung und Bereitstellung des Zellmaterials bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meiner Oma sowie bei all meinen Freunden bedanken, die für mich das Leben neben der Arbeit so abwechslungsreich und schön gestalteten.



## Lebenslauf

- geboren am 12.02.1972 in Berlin
- Schulbildung : September 1978 bis August 1988 an der Allgemeinbildenden Zehnklassischen Oberschule in Berlin
- September 1988 Beginn einer Lehre für Tierzucht in Steinhagen / Schwerin
- Juni 1989 Ausreise aus der DDR
- weitere Schulbildung : September 1989 bis Juni 1992 mit Abiturabschluss am Allgäu-Gymnasium in Kempten / Allgäu
- November 1992 bis Oktober 1993 Absolvierung eines Freiwilligen Sozialen Jahres am Kreiskrankenhaus Kempten
- Studium : Oktober 1993 Beginn des Biologie (Diplom)- Studiums an der Humboldt-Universität zu Berlin
- Oktober 1995 Abschluss des Grundstudiums mit Vordiplom
- Oktober 1995 bis April 1999 Hauptstudium mit den Schwerpunkten Molekularbiologie / Genetik und Zoologie / Parasitologie
- 1997 bis 1998 zwei Urlaubssemester zur Finanzierung des Studiums
- Wintersemester 1999/2000 Diplomarbeit „ Molekulare Phylogenie cyclophyllider Bandwürmer mit Hilfe eines Fragmentes der großen Untereinheit des mitochondrialen rRNA-Genes“ am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
- August 2000 Abschluss des Studiums mit der Erlangung des Grades Diplom-Biologe
- Mai 2001 Beginn als Doktorand am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT in Nuthetal (Bergholz-Rehbrücke)

### **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Des weiteren bestätige ich, dass diese Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Xenia Marschan, Potsdam, 27. Januar 2005