

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE GENETIK

---



**Analyse der Genexpression  
von humanen T-Lymphocyten und Natural Killer-Zellen  
mittels Oligonucleotid Fingerprinting**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Jana Illiger  
geb. am 22.12.1973 in Havelberg

Berlin, Mai 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 02.12.2002

## Abkürzungen

A	Adenin
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidest.
AK	Antikörper
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
AMV-RT	reverse Transkriptase des aviären Myeloblastose-Virus
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ci	Curie
CLL	chronische lymphoblastische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
dATP	Desoxy-Adenosin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dGTP	Desoxy-Guanosin-5`-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-5`-triphosphat
dsDNA	<i>double stranded</i> DNA, Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>

g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
Km <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
l	Liter
m	milli
M	Molarität
MTP	Microtiterplatte
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
$\mu$	micro
$\mu$ l	Microliter
n	nano
N	Nucleotid
Na	Natrium
NaOAc	Natriumacetat
n.d.	<i>not determined</i>
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
OD	optische Dichte
oligo(dT)	oligo-Desoxythymidin
ONF	Oligonucleotid Fingerprinting

p	pico
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	picomol
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen je Minute
RT	reverse Transkriptase, reverse Transkription, Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
Sarcosyl	N-Lauroyl-Sarcosin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
ssDNA	<i>single stranded</i> DNA, Einzelstrang-DNA
SS-DNA	<i>salmon sperm</i> DNA (Lachsspermien-DNA)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichlor-Essigsäure
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit(s) (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht(kultur)
UV	Ultraviolett

vgl.

vergleiche

Vol.

Volumen

w. o.

wie oben

X-Gal

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

z.B.

zum Beispiel

ZNS

Zentralnervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Allgemeine Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Krebs</b>	<b>5</b>
1.2.1	Ethiologie der Carcinogenese	7
1.2.1.1	Bedingungen für die Entstehung von Krebs	13
1.2.1.2	Tumorzell-Widerstandsmechanismen - Escape- und Enhancement-Mechanismen	13
1.2.2	Proto-Onkogene - Onkogene	14
1.2.2.1	Onkogen-Klassen	15
<b>1.3</b>	<b>Hämatoblastische Erkrankungen - Leukämien</b>	<b>18</b>
1.3.1	Einteilung der Leukämien	19
1.3.1.1	Einteilungskriterien der Leukämie	20
1.3.2	Symptome der Leukämie	20
1.3.3	Therapie der Leukämie	20
1.3.3.1	Behandlungsschema einer Leukämieerkrankung	21
1.3.4	Häufigkeiten der Leukämien und prognostische Marker	22
1.3.5	Akute lymphoblastische Leukämien (ALL)	24
1.3.6	Warum T-Lymphocyten und Natural Killer-Zellen?	25
1.3.6.1	Hämatopoese	25
1.3.6.2	Molekulare Charakterisierung der T- und NK-Lymphocyten	26
<b>1.4</b>	<b>Array-Techniken in der Immunologie</b>	<b>32</b>
<b>1.5</b>	<b>Oligonucleotid Fingerprinting</b>	<b>39</b>
1.5.1	mRNA - Spiegel der Expression der Zelle	39
1.5.2	cDNA-Bibliotheken - direktional klonierte Bibliotheken	40
1.5.3	Oligonucleotid Fingerprinting und Clustering-Analyse	41
<b>1.6</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>46</b>

<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN</b>	<b>48</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>48</b>
2.1.1	Software	49
2.1.2	Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools	50
2.1.3	Kits	50
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>51</b>
2.2.1	Nucleotide	53
2.2.2	radioaktive Nucleotide	53
<b>2.3</b>	<b>Materialien und Chemikalien für die Zellkultur</b>	<b>53</b>
<b>2.4</b>	<b>Enzyme / Restriktionsendonucleasen</b>	<b>53</b>
<b>2.5</b>	<b>Größenstandards</b>	<b>54</b>
2.5.1	DNA-Größenstandards	54
2.5.2	RNA-Größenstandard	55
<b>2.6</b>	<b>Nährmedien</b>	<b>56</b>
2.6.1	flüssige Nährmedien	56
2.6.2	feste Nährmedien	56
<b>2.7</b>	<b>Stämme, Zell-Linien und Vektoren</b>	<b>57</b>
2.7.1	Bakterien-Stämme	57
2.7.2	Zell-Linien	57
2.7.3	Vektoren	58
<b>2.8</b>	<b>Antibiotikakonzentrationen</b>	<b>58</b>
<b>2.9</b>	<b>Oligonucleotide</b>	<b>58</b>
2.9.1	Primer für die PCR und Sequenzierung	58
2.9.2	Oligonucleotide für die Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierungen	59
<b>2.10</b>	<b>Lösungen</b>	<b>60</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Stammhaltung</b>	<b>65</b>
3.1.1	Zellkultur	65
3.1.2	Kryokonservierung von Zell-Linien	65
3.1.3	Kultur und Kryokonservierung der Bibliotheken	65
3.1.4	Kryokonservierung von Bakterienstämmen	66
<b>3.2</b>	<b>Konstruktion einer Bibliothek</b>	<b>67</b>



3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	67
3.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol <sup>®</sup> Reagent .....	67
3.2.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) .....	68
3.1.2	Isolierung von mRNA .....	69
3.1.1.1	Isolierung von mRNA mit dem Dynabeads <sup>®</sup> mRNA Purification Kit (Dyna) .....	69
3.1.1.2	Isolierung von mRNA mit Oligotex <sup>™</sup> (Qiagen) .....	70
3.1.2	Reverse Transkription - cDNA-Synthese .....	71
3.1.2.1	Erststrang-Synthese .....	72
3.1.2.2	Zweitstrang-Synthese .....	73
3.1.2.3	<i>SalI</i> -Adapter-Addition .....	73
3.1.2.4	<i>NotI</i> -Restriktionsverdau .....	74
3.1.2.5	Säulen-Chromatographie - <i>Size Fractionation</i> - .....	74
3.1.3	Radioaktive Markierung eines Größenstandards .....	74
3.1.4	Alkalische Gel-Analyse der Erststrang-cDNA .....	75
3.1.5	Plasmid-Konstrukte .....	77
3.1.6	Ligation der cDNA in den Vektor .....	77
<b>3.2</b>	<b>Fällung von DNA</b> .....	<b>77</b>
<b>3.3</b>	<b>Fällung von RNA</b> .....	<b>77</b>
<b>3.4</b>	<b>Herstellung elektrokompenter Zellen</b> .....	<b>78</b>
<b>3.5</b>	<b>Transformation / Elektroporation</b> .....	<b>78</b>
<b>3.6</b>	<b>Transfer von Kolonien</b> .....	<b>79</b>
<b>3.7</b>	<b>PCR in großem Maßstab</b> .....	<b>80</b>
<b>3.8</b>	<b>Aufreinigung von PCR-Produkten</b> .....	<b>81</b>
3.8.1	Aufreinigung der PCR-Produkte (High Pure PCR Product Purification Kit; Roche) ...	81
3.8.2	Aufreinigung der PCR-Produkte (QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit, Qiagen) .....	82
<b>3.9</b>	<b>DNA/RNA-Konzentrations- und Qualitätsbestimmung</b> .....	<b>83</b>
3.9.1	Spektrophotometrische Bestimmung von DNA und RNA .....	83
3.9.2	Bestimmung der RNA-Qualität und Quantität mittels LabChip <sup>®</sup> (Agilent) .....	83
<b>3.10</b>	<b>Gelelektrophorese</b> .....	<b>84</b>
<b>3.11</b>	<b>Sequenzierung</b> .....	<b>85</b>
<b>3.12</b>	<b>Erstellen der cDNA-Filter</b> .....	<b>87</b>
3.12.1	Transfer der PCR-Produkte auf Nylon-Membranen .....	87
3.12.2	Prozessieren der cDNA-Filter .....	88
<b>3.13</b>	<b>Erstellen der Kolonie-Filter</b> .....	<b>89</b>
3.13.1	Transfer der Kolonien auf Nylon-Membranen .....	89
3.13.2	Prozessieren der Kolonie-Filter .....	89

<b>3.14</b>	<b>Hybridisierungen</b>	<b>91</b>
3.14.1	Background-Hybridisierung	91
3.14.2	Oligonucleotid-Hybridisierung in Rollerflaschen	92
3.14.3	Radioaktive Longprobe-Hybridisierung	93
3.14.4	Strippen der mit radioaktiven Proben hybridisierten Filter	94
3.14.5	Nichtradioaktive Longprobe-Hybridisierung -DIG-System-	95
<b>3.15</b>	<b>Bildanalyse</b>	<b>97</b>
<b>3.16</b>	<b>Radioaktive Markierung von DNA-Sonden</b>	<b>98</b>
<b>3.17</b>	<b>Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden</b>	<b>99</b>
<b>3.18</b>	<b>Northern-Hybridisierung</b>	<b>100</b>
3.18.1	Northern-Gelelektrophorese - Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese	100
3.18.2	Northern-Blotting - Vacuum Blotting	100
3.18.3	Northern-Hybridisierung	102
3.18.4	Waschen der Membranen und Autoradiographie	103
3.18.5	Strippen der RNA-Membranen	103
<b>3.19</b>	<b>Komplex-Hybridisierung</b>	<b>104</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>105</b>
<b>4.1</b>	<b>Erstellen der Grundlagen für das Oligonucleotid Fingerprinting - Konstruktion der Bibliotheken</b>	<b>107</b>
4.1.1	mRNA-Isolierung aus Jurkat und NKL Zell-Linien	107
4.1.2	cDNA-Synthese aus der mRNA	108
4.1.3	Größenfraktionierung der cDNA-Fragmente	109
4.1.4	Ligation und Transformation	110
4.1.5	Transfer der Kolonien	111
4.1.6	Analyse der Bibliotheken	113
4.1.7	PCR in großem Maßstab	114
4.1.8	Transfer der PCR-Produkte auf Membranen	116
<b>4.2</b>	<b>Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierungen</b>	<b>120</b>
4.2.1	Background-Hybridisierung	120
4.2.2	Oligonucleotid-Hybridisierung	120
4.2.3	Longprobe-Hybridisierung	123
4.2.4	Normalisieren der Daten	128
<b>4.3</b>	<b>Analyse und Ergebnisse</b>	<b>130</b>

4.3.1	Clustering der Fingerprints .....	130
4.3.2	Co-Clustering und Datenbank-Matching .....	132
4.3.2.1	Cluster-Splitting .....	137
4.3.2.2	Co-Clustering-Ergebnisse .....	142
4.3.3	Northern-Hybridisierung .....	153
4.3.3.1	Northern-Hybridisierungen .....	153
4.3.3.2	Northern-Gelelektrophorese und Vacuum-Blotting .....	155
4.3.4	Rearranging .....	161
4.3.4.1	Erstellen eines Unigene-Sets .....	161
4.3.4.2	Erstellen und Spotten eines Jurkat-Unigene-Sets .....	162
4.3.5	Komplex-Hybridisierung .....	164
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>166</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVE</b> .....	<b>179</b>
<b>6.1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>179</b>
<b>6.2</b>	<b>Perspektiven</b> .....	<b>181</b>
<b>6.3</b>	<b>Summary</b> .....	<b>183</b>
<b>6.4</b>	<b>Perspectives</b> .....	<b>185</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>187</b>
<b>7.1</b>	<b>Vektor pQE30NST</b> .....	<b>187</b>
7.1.1	MCS des Vektors pQE30NST .....	187
7.1.2	Sequenz des Vektors pQE30NST .....	188
<b>7.2</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>190</b>
<b>7.3</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b> .....	<b>198</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1-1	Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 1999	2
Abb. 1-2	Die häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland im Jahr 1999	3
Abb. 1-3	Veränderungen transformierter Zellen	7
Abb. 1-4	Mehrstufenprozeß der Carcinogenese	9
Abb. 1-5	Mögliche Ursachen der Carcinogenese	10
Abb. 1-6	Strategien des Tumor-Enhancement	14
Abb. 1-7	Onkogenlokalisierung auf den humanen Chromosomen	17
Abb. 1-8	Häufigkeit der Leukämien nach Alter und Jahren	19
Abb. 1-9	Medikamente der Leukämietherapie	22
Abb. 1-10	Hämatopoese der Zellen des blutbildenden Systems	26
Abb. 1-11	Abwehrmechanismen der B- und T-Lymphocyten	27
Abb. 1-12	Mechanismus der Antigen-Erkennung bei T-Zellen	28
Abb. 1-13	Mechanismus der Antigen-Erkennung bei Natural Killer-Zellen	30
Abb. 1-14	Prinzip des Oligonucleotid Fingerprintings	42
Abb. 1-15	Prinzip des Clusterings	43
Abb. 3-1	mRNA Aufreinigung mit Dynabeads®	70
Abb. 3-2	Sequenz des <i>NotI</i> -Primer-Adapters	71
Abb. 3-3	Sequenz des <i>SalI</i> -Adapters	71
Abb. 3-4	Berechnung der spezifischen Aktivität des [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP	72
Abb. 3-5	Berechnung der Ausbeute an Erststrang-cDNA	72
Abb. 3-6	Strategie der cDNA-Synthese	76
Abb. 3-7	RNA 6000 LabChip®	84
Abb. 3-8	Darstellung einer Sequenz	86
Abb. 3-9	Pinorder, Pinposition und 5x5-Pattern	88
Abb. 3-10	Reaktion des AttoPhos-Substrates mit der alkalischen Phosphatase	96
Abb. 3-11	Schema der Einteilung eines Filters	97
Abb. 3-12	Vacuum-Blotter	101
Abb. 3-13	Aufbau des Blotting-„Sandwiches“	101
Abb. 4-1	Überblick über das ONF	106
Abb. 4-2	Qualitätskontrolle präparierter RNA	107
Abb. 4-3	Radioaktiv markierte cDNA nach Gelelektrophorese	109
Abb. 4-4	Picking-Roboter	112

Abb. 4-5	Picking-Roboter - Detailansicht .....	113
Abb. 4-6	Thermocycler PTC225 .....	115
Abb. 4-7	Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente nach <i>large scale</i> PCR .....	116
Abb. 4-8	Spotting-Roboter .....	117
Abb. 4-9	Darstellung eines Blockes des 5x5 Patterns .....	118
Abb. 4-10	Oligonucleotid-Hybridisierung .....	122
Abb. 4-11	Korrelation der x- und y-Duplikate .....	123
Abb. 4-12	Longprobe-Hybridisierung - Ausschnitt eines Filters .....	124
Abb. 4-13	Fingerprints der Klone eines Co-Clusters .....	131
Abb. 4-14	Cluster-Splitting .....	138
Abb. 4-15	Gelelektrophorese amplifizierter Klone der Co-Cluster 22 und 29 (GAPDH) .....	139
Abb. 4-16	Visualisierungen der Fingerprints der Co-Cluster 22 und 29 (GAPDH) .....	140
Abb. 4-17	Alignment von Klonen der Co-Cluster 22 und 29 .....	141
Abb. 4-18	Verteilung der Co-Clustergrößen .....	143
Abb. 4-19	Co-Clusterverteilung .....	145
Abb. 4-20	Plasmidpräparation Co-Cluster 3 und 4 .....	150
Abb. 4-21	Vergleich der Fingerprints der Co-Cluster 3 und 4 .....	151
Abb. 4-22	Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA für Northern-Blots .....	155
Abb. 4-23	Analyse der RNA am BioAnalyzer 2100 .....	156
Abb. 4-24	Northern-Hybridisierung mit GAPDH zur Normalisierung .....	157
Abb. 4-25	Northern-Hybridisierung mit den Sonden für CD3E $\epsilon$ , NKG2-D, HLA-A2, TALLA-1 .....	158
Abb. 4-26	Background-Hybridisierung des Jurkat Unigene-Sets .....	163
Abb. 7-1	Multi Cloning Site des Vektor pQE30NST .....	187
Abb. 7-2	Sequenz des Vektors pQE30NST .....	189
Tab. 2-1	Verwendete Größenstandards und deren Fragmentgrößen .....	54
Tab. 2-2	Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften .....	57
Tab. 2-3	Die verwendeten Zell-Linien Jurkat und NKL und ihre Eigenschaften .....	57
Tab. 2-4	Vektoren und ihre Eigenschaften .....	58
Tab. 2-5	Antibiotika, einzusetzende Konzentrationen und Lösungsmittel .....	58
Tab. 2-6	Primer für die PCR und Sequenzierung .....	58
Tab. 2-7	Für die Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierung verwendete Oligos .....	59

Tab. 3-1	PCR-Puffer.....	80
Tab. 3-2	PCR-Mix.....	80
Tab. 3-3	Eigenschaften verschiedener für die Sequenzierung eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe.....	85
Tab. 4-1	Größenfraktionierung der cDNA.....	110
Tab. 4-2	Signalhäufigkeit der Longprobe-Hybridisierungen.....	126
Tab. 4-3	Relative Häufigkeit der Expression einiger als Longprobe hybridisierter Gene.....	127
Tab. 4-4	Verteilung der Clustergrößen der Bibliotheken Jurkat und NKL.....	132
Tab. 4-5	Die ersten 100 Co-Cluster.....	136
Tab. 4-6	Clustergrößen und deren Verteilung.....	143
Tab. 4-7	Differentiell exprimierte Gene in der Zell-Linie Jurkat.....	146
Tab. 4-8	Differentiell exprimierte Gene in der Zell-Linie NKL.....	146
Tab. 4-9	Differentiell exprimierte Gene der Zell-Linie Jurkat.....	154
Tab. 4-10	Differentiell exprimierte Gene der Zell-Linie NKL.....	154