

Identifikation differentiell exprimierter Gene der
prozyklischen und der Blutbahn-Form von *Trypanosoma
brucei* durch Repräsentative Differenzanalyse und Microarray-
Technologie

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich für Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität in Berlin

vorgelegt von

Susanne Diehl
aus Schortens

Berlin 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Kress

Datum der Disputation: 1. Juli 2004

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	3
<i>Abkürzungen</i>	8
1. <i>Einleitung</i>	10
1.1. <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.1.1. Schlafkrankheit	10
1.1.2. Krankheitsverlauf und Symptomatik der Schlafkrankheit	11
1.1.3. Diagnose und Therapie	12
1.1.4. Prophylaxe und Vektorkontrolle	13
1.1.5. Phylogenetische Einordnung.....	14
1.1.6. Lebenszyklus.....	15
1.1.7. Transkription und Regulation der Genexpression.....	16
1.1.8. Antigenvariation.....	18
1.1.9. Genomgröße und Organisation	19
1.1.10. Genomprojekte.....	20
1.2. Funktionelle Genomanalyse	21
1.2.1. Einführung	21
1.2.2. Repräsentative Differenzanalyse.....	21
1.2.3. DNA-Microarrays	23
1.2.3.1. Prinzip der DNA-Microarray-Technologie	23
1.2.3.2. Datenbearbeitung	27
1.2.3.3. Datenanalyse	29
1.2.4. Identifikation stadienspezifisch exprimierter Gene von <i>T. brucei</i>	31
2. <i>Material und Methoden</i>	33
2.1. Material	33
2.1.1. Chemikalien	33
2.1.2. Reagenziensätze	35
2.1.3. Enzyme.....	35
2.1.4. Oligonukleotide.....	36
2.1.4.1. Repräsentative Differenzanalyse.....	36
2.1.4.2. Amplifikation der <i>T. brucei</i> Bibliothek	36
2.1.4.3. RT-PCR.....	36
2.1.5. Bakterienstämme und Zelllinien	36
2.1.6. Lösungen und Puffer.....	37
2.1.6.1. Allgemein	37
2.1.6.2. cDNA-RDA.....	38

2.1.6.3. DNA-Macroarrays.....	38
2.1.6.4. DNA-Microarrays	38
2.1.7. Geräte	39
2.1.8. Verbrauchsmaterial	39
2.1.9. Software und Internetadressen	40
2.1.9.1. Software	40
2.1.9.2. Internetadressen.....	40
2.1.10. Weitere Materialien und Hilfsmittel	40
2.2 Methoden	41
2.2.1. Kultivierung von <i>T. brucei</i>	41
2.2.2. Isolierung von RNA	41
2.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol [®]	41
2.2.2.2. Isolierung von PolyA ⁺ -RNA	42
2.2.2.3. Fluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	42
2.2.2.4. RNA Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.3. Repräsentative Differenzanalyse.....	43
2.2.3.1. Erststrang cDNA-Synthese.....	43
2.2.3.2. Zweitstrang cDNA-Synthese.....	43
2.2.3.3. Restriktionsverdau der cDNA mit DpnII	43
2.2.3.4. Ligation der R-Bam-Adaptoren.....	44
2.2.3.5. Herstellung der Repräsentation	44
2.2.3.6. Herstellung des Drivers	45
2.2.3.7. Herstellung des Testers	45
2.2.3.8. Erste subtraktive Hybridisierung.....	46
2.2.3.9. Herstellung des ersten Differenzproduktes (DP1).....	46
2.2.3.10. Austausch der Adaptoren (J-Bgl-24 Adaptor → N-Bgl-24 Adaptor)	47
2.2.3.11. Zweite subtraktive Hybridisierung und Herstellung des zweiten Differenzproduktes (DP2) ..	48
2.2.3.12. Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	48
2.2.4. Erstellung von geordneten Klonbibliotheken.....	48
2.2.4.1. RDA-Bibliothek	48
2.2.4.2. Genomische <i>T. brucei</i> Bibliothek.....	49
2.2.5. PCR-Amplifikation von Klonbibliotheken	50
2.2.5.1. PCR-Amplifikation	50
2.2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese	51
2.2.6. Herstellung von DNA-Arrays.....	51
2.2.6.1. Herstellung von DNA-Macroarrays	51
2.2.6.2. Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin	52
2.2.6.3. Spotten von DNA-Microarrays	52
2.2.6.4. Nachbehandlung von DNA-Microarrays	53
2.2.7. Markierung von RNA	53

2.2.7.1. Radioaktive Markierung von RNA	53
2.2.7.2. Fluoreszenz Markierung von RNA	54
2.2.7.3. Reinigung der Markierungsreaktionen.....	54
2.2.7.4. Bestimmung der Einbaurate von Fluoreszenzmolekülen	54
2.2.8. Hybridisierungen.....	55
2.2.8.1. Hybridisierungen auf Macroarrays.....	55
2.2.8.2. Hybridisierungen auf Microarrays	56
2.2.9. Auswertung von Macroarrays.....	56
2.2.10. Auswertung von Microarrays.....	56
2.2.10.1. Bilderzeugung	56
2.2.10.2. Bildauswertung.....	57
2.2.10.3. Datenbearbeitung	57
2.2.10.4. Datenanalyse	58
2.2.10.5. Identifikation von differenziell exprimierten Genen	58
2.2.11. RT-PCR Analyse.....	58
2.2.11.1. Primerdesign.....	58
2.2.11.2. LiCl-Fällung von Gesamt-RNA	59
2.2.11.3. RT-PCR.....	59
3. Ergebnisse.....	60
3.1. Repräsentative Differenzanalyse	60
3.1.1. Subtraktive Hybridisierung	60
3.1.2. Isolierung von RDA-Differenzprodukten durch Herstellung geordneter RDA-Bibliotheken	61
3.1.3. Verifizierung der differentiellen Expression durch Hybridisierung von cDNA auf RDA-Microarrays	61
3.1.4. Identifizierung der RDA-Produkte durch Sequenzierung	63
3.2. Trypanosoma brucei Microarray-Analyse.....	64
3.2.1. Aufbau des Microarrays.....	64
3.2.1.1. Allgemeine Einführung	64
3.2.1.2. Herstellung einer geordneten genomischen Klonbibliothek von T. brucei TREU 927/4.....	64
3.2.1.3. Herstellung der Microarrays.....	64
3.2.2. Datenbearbeitung	68
3.2.2.1. Allgemeine Einführung in die Datenbearbeitung.....	68
3.2.2.2. Normalisierung.....	69
3.2.2.3. Optimierung der Datenfilterung	72
3.2.3. Validierung der Microarray-Technologie	76
3.2.3.1. Allgemeine Einführung	76
3.2.3.2. Präzision	77
3.2.3.3. Akkuratheit der Messung der Signalintensitäten.....	78
3.2.4. Datenanalyse	79

3.2.4.1. Überprüfung auf Normalverteilung	79
3.2.4.2. Signifikanzanalyse für den Kontrolldatensatz.....	81
3.2.5. Identifizierung von stadienspezifischen Genen in der Blutbahnform und der prozyklischen Form von <i>T. brucei</i>	83
3.2.5.1. Experimenteller Aufbau	83
3.2.5.2. Analyse der Hybridisierungsdaten	83
3.2.5.3. Identifikation der differenziell exprimierten Gene	87
3.2.5.4. Verifikation der Genexpression mit RT-PCR	90
4. Diskussion.....	91
4.1. Funktionelle Genomanalyse zur Identifizierung stadienspezifischer Gene von <i>Trypanosoma brucei</i>	91
4.1.1. Allgemeine Fragestellung	91
4.1.2. Repräsentative Differenzanalyse.....	92
4.1.2.1. Vor-und Nachteile der Repräsentativen Differenzanalyse	92
4.1.2.2. Die Repräsentative Differenzanalyse zur Identifizierung stadienspezifischer Gene.....	93
4.1.2.3. Eigenschaften des genomischen <i>T. brucei</i> Microarrays	93
4.2. Optimierung der Datenbearbeitung.....	95
4.2.1. Normalisierung.....	95
4.2.2. Datenfilterung	97
4.3. Validierung der Microarray-Technologie	99
4.3.1. Allgemeine Einführung	99
4.3.2. Präzision.....	99
4.3.3. Akkuratheit der Signalintensitätswerte (Konkordanzanalyse).....	100
4.4. Datenanalyse	101
4.4.1. Prüfung auf Normalverteilung	101
4.4.2. Signifikanzanalyse für den Konkordanzdatensatz	102
4.5. Identifizierung und Validierung von stadienspezifischen Genen in der Blutbahnform und der prozyklischen Form von <i>T. brucei</i> mittels Microarray-Analyse	103
4.5.1. Experimenteller Aufbau	103
4.5.2. Identifikation differentiell exprimierter Gene	103
4.5.3. Schlußfolgerung und Ausblick.....	106
5. Zusammenfassung	108
6. Summary.....	109
7. Literaturverzeichnis	110
Eigene Veröffentlichungen.....	120

8. *Lebenslauf*..... 121

9. *Danksagung*..... 122