

Aus der medizinischen Klinik,  
mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

# **Differentielles Genexpressionsmuster in chronischen lymphatischen Leukämiezellen vom B- Zell-Typ (B-CLL-Zellen)**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Max Simon Schlaak  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Dudenhausen

Gutachter:

1. PD Dr. F. Schriever
2. Prof. Dr. Dr. J. Klose
3. Prof. Dr. U. Keilholz

Datum der Promotion: 10.01.2003

## Abstrakt-deutsch

Schlagworte:

B-CLL  
Differentielle Genexpression  
CD20  
I $\kappa$ B

Die B-CLL ist eine niedrigmaligne Erkrankung, die im höheren Lebensalter auftritt und für die es weiterhin keine dauerhaft kurative Therapie gibt.

Die Erforschung der genetischen Grundlagen dieser Krankheit könnte Erkenntnisse über die Funktionsmechanismen und neue Diagnose- und Therapieansätze erbringen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Genbank von CLL-Patienten bzw. gesunden Spendern zu erstellen, um Gene, die für die Entstehung der Erkrankung mitverantwortlich sein könnten, zu identifizieren.

Die subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) wurde als Methode eingesetzt, um cDNA-Mischungen zu generieren, in denen differentielle Gene angereichert wurden. In dieser Arbeit wurden drei differentielle Gene identifiziert. Eines dieser Gene kodiert den Oberflächenmarker CD5, der bei CLL-Erkrankten stärker exprimiert wurde. Da CD5 ein für die B-CLL relativ spezifischer Marker ist, bestätigte dieses Ergebnis die Qualität der Genbank.

Mit Hilfe der SSH wurde ein Verlust der Expression der cDNA für den Oberflächenmarker CD20 bei CLL-Erkrankten nachgewiesen. CD20 ist möglicherweise ein Kalziumkanal und wird als Ziel des anti-CD20-Antikörpers Rituximab verwendet. Der Verlust von CD20 im Verlauf der Erkrankung konnte in dieser Arbeit angedeutet werden.

Weiterhin wurde eine verringerte Expression von cDNA für I $\kappa$ B $\alpha$  (Mad-3) bei CLL-Patienten entdeckt. Der Transkriptionsfaktor I $\kappa$ B $\alpha$  spielt im zellulären Ablauf der Apoptose eine wichtige Rolle. Phosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert die Wirkung von NF- $\kappa$ B. Eine Reduktion von I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA könnte ebenfalls die Funktion von NF- $\kappa$ B beeinflussen. Dieses Ergebnis könnte auch für zukünftige immuntherapeutische Ansätze von Bedeutung sein. Weiterhin sind die nachgewiesenen Gene interessant für die Technik des „DNA-Microarrays“. Diese schnelle Methode ermöglicht kostengünstige Diagnosen und könnte daher eine zukunftsweisende Alternative zu herkömmlichen Ansätzen bieten.

In der vorliegenden Arbeit konnten differentielle Transkripte auf mRNA-Ebene bei B-CLL-Erkrankten und gesunden Kontrollen festgestellt und untersucht werden. Die Ergebnisse geben neue Einsichten über Onkogene und Tumorsuppressorgene in der B-CLL und eröffnen zukünftige immuntherapeutische Ansätze.

## Abstract-englisch

### Keywords:

B-CLL  
Differential gene expression  
CD20  
I $\kappa$ Ba

The B-CLL is a malignancy that appears in the higher age and for which it gives further no durably curative therapy. The investigation of the genetic bases of this illness could furnish understandings of the function mechanisms and new diagnosis and therapy extensions. It was the goal of this work of generating a gene bank of CLL-patients and healthy donors, in order to identify genes, that could be responsible for the origin of the disease. The subtractive suppressive hybridisation (SSH) was inserted as a method in order to generate cDNA-mixtures, in which differential genes were enriched. In this work, three differential genes were identified. One of these genes codes for CD5 that in CLL-patients was stronger expressed. Because CD5 is a marker relatively specific for the B-CLL, this result confirmed the quality of the gene bank. By means of the SSH, a loss of the Expression of the cDNA was proved for CD20 in CLL-patients. Possibly CD20 is a calcium canal and is used as a goal of the anti-CD20-antibody Rituximab. The loss of CD20 in the progress of the disease could be indicated in this work. Further a diminished expression was discovered by cDNA for I $\kappa$ Ba (Mad-3) in CLL-patients. The transcription factor I $\kappa$ Ba plays an important role in the cellular system of apoptosis. Phosphorylated I $\kappa$ Ba is inhibiting the effect of NF- $\kappa$ B. A reduction of I $\kappa$ Ba-cDNA could influence also the function of NF- $\kappa$ B. This result could be interesting for future immune therapeutic extension. Further the proved genes are interesting for the technology of the „DNA-Microarrays“. This fast method enables favorable diagnoses and could offer therefore a leading-edge alternative to conventional extensions. In the existing work, differential transcripts could be assessed on mRNA-levels in B-CLL-patients and healthy donors. The results give new insights over oncogenes and tumor surpressing genes in the B-CLL and open future immune therapeutic extensions.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
1.1	Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) .....	7
1.2	Das klinische Bild der CLL .....	8
1.3	Fragestellung .....	11
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	12
2.1	Geräte .....	12
2.2	Verbrauchsmaterial .....	12
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	17
3.1	Ficollierung der Blutprobe .....	17
3.2	Positivselektion der B-Lymphozyten mit Dynabeads M-450 CD19 .....	19
3.3	Isolierung der Total-RNA aus den isolierten B-Lymphozyten .....	22
3.4	SMART PCR cDNA-Synthese .....	23
3.5	Reinigung und Verdau der ds cDNA .....	26
3.6	Subtraktive suppressive Hybridisierung .....	27
3.6.1	Adaptor Ligation .....	28
3.6.2	Ligations Kontrolle .....	29
3.6.3	Erste Hybridisierung .....	30
3.6.4	Zweite Hybridisierung .....	30
3.6.5	Erste Suppressive PCR .....	31
3.6.6	Zweite suppressive PCR nach dem Nested-Prinzip .....	32
3.6.7	PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz .....	33
3.7	Klonierung .....	34
3.7.1	Klonierung der subtrahierten cDNA in den pT-Adv-Vektor .....	35
3.7.2	Transformation .....	35
3.8	Kolonie-PCR .....	36
3.9	Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA .....	37
3.10	Nicht-radioaktiver „Dot-Blot“ .....	38
3.11	Sequenzierung und Primer Design .....	39
3.12	RT-Reaktion .....	39
3.13	Semiquantitative RT-PCR .....	40
3.14	Foto-Dokumentation .....	41
3.15	Auswertung .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	43

4.1	Etablierung einer differentiellen Genbank von normalen B-Lymphozyten bzw. malignen B-CLL-Zellen .....	43
4.1.1	Isolierung der B-Zellen .....	43
4.1.2	Isolierung von Total-RNA .....	45
4.1.3	Synthese von cDNA mit SMART PCR .....	46
4.1.4	Verdau der cDNA-Proben mit Rsa-I .....	47
4.1.5	Amplifikation der differentiellen Transkripte mittels Suppressiver PCR48	
4.1.6	PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz .....	49
4.1.7	Klonierung der subtrahierten cDNA-Populationen in einen pt-Adv- Vektor, Transformation von kompetenten E. coli's und Kolonie-PCR .....	50
4.1.8	Nicht-radioaktiver „Dot-Blot“ .....	51
4.1.9	Sequenzierung der differentiellen Klone .....	53
4.1.10	Semiquantitative PCR .....	53
4.2	Auswertung einer differentiellen Genbank.....	56
4.2.1	Auswertung von CD5 .....	61
4.2.2	Auswertung von CD20 .....	62
4.2.3	Auswertung des I $\kappa$ B/Mad-3 Gens (interne Probennummer 1438).....	64
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
5	<b>Diskussion</b> .....	68
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	76
7	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	77

# 1 Einleitung

## 1.1 Die chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist eine hämatologische Systemerkrankung, die mit einem Anteil von 30 % die häufigste Leukämie der Erwachsenen in der westlichen Welt darstellt. Sie ist eine Erkrankung des Alters und tritt sehr selten vor dem 40. Lebensjahr auf. Zwei Drittel der erkrankten Patienten sind älter als 60 Jahre. Insgesamt kommt es pro Jahr zu 2-3 Neuerkrankungen auf 100 000 Einwohner, bei 55- bis 60jährigen liegt die Inzidenz bei 5 und bei den über 80jährigen bei ca. 30 pro 100 000 Einwohner [1].

Die CLL ist durch eine Akkumulation reif wirkender Lymphozyten gekennzeichnet. In über 95% der Fälle liegt eine klonale Expansion neoplastischer B-Lymphozyten vor, in nur 5 % von T-Lymphozyten. CLL-Zellen weisen eine niedrige Proliferationsrate bei erheblich verlängerter Lebensdauer auf. Die immuninkompetenten B-Zellen befinden sich zumeist in der G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub>-Phase [2].

Hinsichtlich ihres Reifungsgrades sind die CLL-Zellen zwischen den Prä-B-Zellen und den reifen B-Zellen einzuordnen. Die CLL wird als niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom in die Reihe der peripheren B-Zell-Neoplasien eingeordnet.

Die Diagnose der B-CLL lässt sich aus dem Blutbild, dem Differentialblutbild und der Immunphänotypisierung stellen [3].

Die B-CLL Lymphozyten weisen einen schmalen Zytoplasmasaum und einen dichten Kern mit teilweise verklumpten Chromatin ohne Nukleolen auf. Die Monoklonalität der Zellen wird mittels Doppelmarkierung von CD19/Kappa oder CD19/Lambda nachgewiesen. Der Immunphänotyp ist durch eine schwache Expression von Oberflächenimmunglobulinen, der Koexpression von CD5 und den typischen B-Zell-Markern CD19, CD20 und der Positivität von CD23 charakterisiert. Weiterhin lassen sich B-CLL-Zellen in CD38 positive und CD38 negative Lymphozyten unterscheiden. Die kleinere Gruppe der CD38 positiven Zellen ist durch eine höhere Apoptoserate charakterisiert und scheint den Keimzentrums-B-Zellen zu ähneln. In Keimzentren, wie z.B. Lymphknoten und Milz reifen naive B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. B-Zellen können vor oder nach der Reifung im Keimzentrum entarten. Die malignen post-Keimzentrum-Zellen ähneln den Gedächtnis-Zellen und haben

gegenüber den naiven prä-Keimzentrum CLL-Zellen Mutationen in der IgVH Region, durch die die schwere Kette der Immunglobuline kodiert wird [4,5].

## 1.2 Das klinische Bild der CLL

Das klinische Bild der CLL ist auf die erheblich verlängerte Überlebenszeit der Lymphozyten mit Akkumulation und Infiltration in Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Milz und z.T. in die Leber zurückzuführen. Viele Patienten mit CLL bleiben in den frühen Stadien ihrer Erkrankung asymptomatisch, deshalb wird in einer Vielzahl der Fälle eine CLL zufällig entdeckt. Die ersten Symptome können sich in Leistungsminderung und Müdigkeit, Lymphknotenschwellungen und häufigen Infekten äußern.

Die Akkumulation von B-Zellen im Knochenmark, peripherem Blut und in lymphatischen Organen ist für die CLL charakteristisch. Die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark führt im Verlauf der Krankheit zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit zunehmender Anämie, Thrombozytopenie und auch Neutropenie.

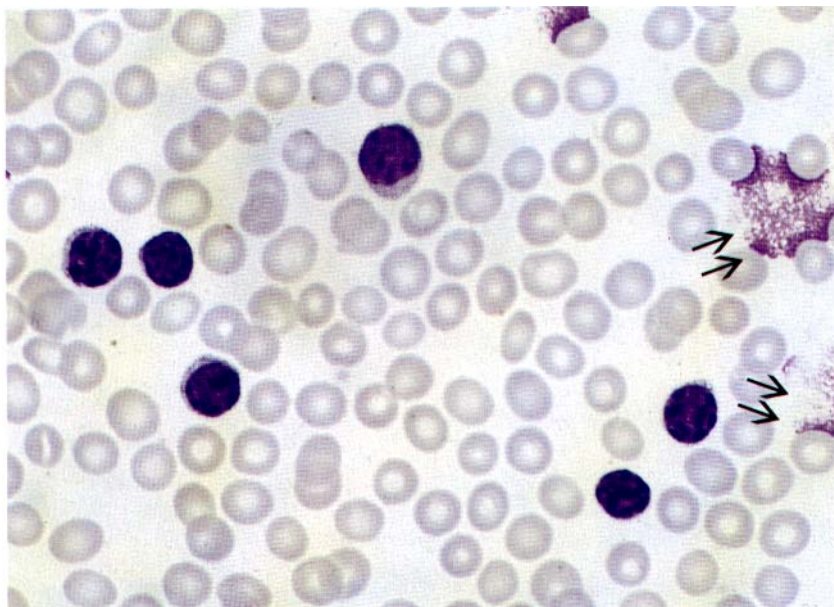


Abb. 1: Ausstrich des peripheren Blutes mit der typischen Morphologie der leukämischen Tumorzellen. Die am rechten oberen Bildrand markierten Kerntrümmer werden Gumprecht'sche Kernschatten genannt [6]

Ein Antikörpermangelsyndrom, das bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung beobachtet wird, stellt mit der Neutropenie den hauptsächlichen Grund für die

erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit häufig letalem Verlauf dar. Das Ausmaß der Hypogammaglobulinämie korreliert mit dem Stadium der Krankheit. Patienten mit CLL haben gegenüber der Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko, an einem Zweitmalignom zu erkranken [3].

Unabhängig vom Stadium treten in 10 % der Fälle auto-immunhämolytische Anämien auf, die durch inkomplette IgG-Autoantikörper verursacht werden.

Blutungen im Spätstadium sind Folge der auftretenden Thrombozytopenie. Infiltration in nicht-lymphatische Gewebe wie Konjunktividen, Pleura, Lunge, Leber und Gonaden kann zu organspezifischen Komplikationen führen.

Die klinische Stadieneinteilung in dieser Arbeit erfolgt nach Binet.

Stadium	Definition	mittlere Überlebenszeit (in Monaten)	Verteilung der Patienten (bei Diagnose)
A	< 3 Lymphknotenregionen befallen Lymphozytose Hb > 10,0 g/dl ( 6mmol/l) Thrombozyten > 100 000/ $\mu$ l	120	55
B	$\geq$ 3 Lymphknotenregionen befallen Hb > 10,0 g/dl (6 mmol/l) Thrombozyten > 100 000/ $\mu$ l	60	30%
C	Hb $\leq$ 10,0 g/dl und/oder Thrombozyten $\leq$ 100 000/ $\mu$ l	24	15

Tab. 1.2: Stadieneinteilung der CLL nach Binet (1981) [1].

Die Ätiologie der CLL ist nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Das Erkrankungsrisiko innerhalb einer Familie ist um das 2-7fache erhöht, wenn Verwandte ersten Grades an einer CLL erkrankt sind. Zytogenetische Aberrationen werden in etwa 80% aller CLL-Erkrankten gefunden, häufig sind Anomalien im Bereich des Chromosoms 13. Normale Karyotypen sind mit einer günstigeren Prognose assoziiert [3].

Es ist bekannt, dass Apoptose-Dysregulationen einen großen Einfluss auf die Pathogenese der B-CLL-Zellen haben [7,8]. Die malignen Zellen weisen eine pathologische Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 auf. Ein verstärktes Vorhandensein von Bcl-2 im Zusammenhang mit dem pro-apoptotischen Protein Bax hat einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung [9].

Die Inhibition der Apoptose scheint eine mögliche Ursache zu sein, dass gängige Chemotherapien keine Heilung der Erkrankung ermöglichen. Standard-Therapie-Schemata bestehen aus Chemotherapien mit Chlorambucil (teilweise in Kombination mit Prednison), Fludarabin, 2-Chlorodeoxyadenosin und Deoxycoformycin und Kombinationstherapien. Aktuelle experimentelle Therapieansätze beinhalten Behandlungen mit Antikörpern gegen die B-Zell-Oberflächenmarker CD20 (Rituximab; Trastuzumab) bzw. CD52 (Campath-1H), wodurch ein Zelltod induziert werden kann [10].

Die Strahlentherapie ist bei sehr großen Lymphknotenschwellungen eine Option. Bei Patienten mit Splenomegalie ist zum Teil eine Splenektomie indiziert und im Verlauf der Erkrankung kann eine Immunglobulinsubstitution zum Einsatz kommen.

Außer den beschriebenen Veränderungen in der Pathogenese der B-CLL sind weitere Defekte in der Apoptose der B-CLL-Zellen noch unbekannt. Daraus ergibt sich die nachfolgend aufgeführte Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

### 1.3 Fragestellung

Aufgrund der noch nicht vollständig geklärten Entstehungsmechanismen und der noch unbefriedigenden Therapieoptionen sind grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen über die differentielle Genexpression in B-CLL-Zellen wichtig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Genbank von CLL-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu erstellen, um mögliche Onkogene und Tumorsuppressorgene in der B-CLL zu entdecken.

Diese Gensequenzen könnten ätiologische Aufschlüsse geben, den Verlauf der Krankheit genauer verständlich machen und neue Ansätze für innovative Therapien liefern. Weiterhin könnten diese Gene für die Diagnostik der Erkrankung interessant sein, indem sie in sogenannten DNA-Chips verwendet werden könnten, die einen schnellen und einfachen Nachweis der CLL ermöglichen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der auf mRNA-Ebene differentiellen Transkripte bei B-CLL-Erkrankten und gesunden Kontrollen und die dadurch resultierenden theoretischen Ansätze über Onkogene und Tumorsuppressorgene und der Bedeutung dieser Gene für das Verständnis der B-CLL.

Folgende Aufgaben wurden gestellt:

Erstellung einer differentiellen cDNA-Bank mit Hilfe der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH).

Identifizierung von differentiellen cDNA Klonen in den etablierten cDNA-Banken über einen nicht-radioaktiven Digoxigenin „Dot-Blot“ und Sequenzierung der inserierten cDNAs mit anschließender Homologiesuche über das BLAST-Programm.

Überprüfung der Signifikanz der differentiellen Expression der cDNAs durch Bestimmung der Expressionsstärke der spezifischen mRNA's in den B-Zellen von mehreren B-CLL-Patienten sowie Normalblutspendern über semiquantitative RT-PCR.

Theoretische Ansätze über die Funktion der differentiellen Genen in B-Zellen, sowie deren Bedeutung für das Verständnis der B-CLL

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Bio Doc II	<i>Biometra</i>
Brutschrank kelvitron t	<i>Heraeus Instruments</i>
Centrifuge 5415 C	<i>Eppendorf</i>
Dialux-Mikroskop	<i>Leitz</i>
Entwickler 45 compact	<i>Protec</i>
FACS Calibur	<i>Becton Dickinson</i>
FACScan	<i>Becton Dickinson</i>
Heizblock Dri-Block DB 2 A	<i>Techne</i>
Lamin Air HB 2472	<i>Heraeus Instruments</i>
Magnetic Particle Concentrator (MPS)	<i>Dynal</i>
Mighty Bright UV-Lampe	<i>Hoefer Scientific Instruments</i>
Mikrowelle 8018 E	<i>Privileg</i>
PE 480 DNA Thermal Cycler	<i>Perkin Elmer</i>
Photoanlage MP 4+	<i>Polaroid</i>
Photos Polaplan 55 PN	<i>Polaroid</i>
Pipetus-Akku	<i>Hirschmann</i>
RNA/DNACalculator Gene Quant II	<i>Pharmacia Biotech</i>
Scanner DuoScript T 1200	<i>Agfa</i>
Scientific Imaging Film 50 13x18 cm	<i>Kodak</i>
Sterilfiltrationseinheit	<i>Nalgene</i>
Varifuge 3. OR	<i>Heraeus Sepatech</i>
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i>
Waage	<i>Kern + Sohn GmbH</i>
Wasserbad, GFL 1086	<i>GFL</i>
WideMini-SubCell+ PP2 79	<i>BioRad</i> <i>V.H-N Elektrophorese</i>
X-omatic cassette	<i>Kodak</i>
Zählkammer	<i>Neubauer</i>

### 2.2 Verbrauchsmaterial

10x PCR Puffer ( Perkin Elmer)

CDS Primer

(TIB Molbiol: 5' - AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT  
TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN)

BCL2-Primer antisense, 1416

(TIB Molbiol : 5'- TTG GGC CAG AAG ATA AAA TGT C)

BCL2-Primer sense, 1416

(TIB Molbiol : 5'- GCA TAA ATG GCA AAG GAA AGA)

Farnesyl p. synthetase-Primer antisense, 1421

(TIB Molbiol : 5'- CGC GCA AGC CCC AGA AAG AC)

Farnesyl p. synthetase-Primer sense, 1421

(TIB Molbiol : 5'- GGA ATT GAT GGC GAG AAG GAG CAC)

VDUP1-Primer antisense, 1427

(TIB Molbiol : 5'- AAC TTG AAC TCA GGG GCA TAC ATA)

VDUP1-Primer sense, 1427

(TIB Molbiol : 5'- GGC CCG CCA CAC TTA CC)

L18a-Primer antisense, 1428

(TIB Molbiol : 5'- GGC CGC GAT CTC CTC CAC CTT CA)

L18a-Primer sense, 1428

(TIB Molbiol : 5'- AAA TGC CAC ACG CCG CCC CTC TAC)

EIF2S3-Primer antisense, 1433

(TIB Molbiol : 5' - GCC GGG GCT CTG AAG TAA AGT CT)

EIF2S3-Primer sense, 1433

(TIB Molbiol : 5'- GAA CGG TGC AGC AGT GAT GGA T)

Mad-3-Primer antisense, 1438

(TIB Molbiol: 5'- TGG GGT CAG TCA CTC GAA GCA CAA)

Mad-3-Primer sense, 1438

(TIB Molbiol : 5'- CGC CCA AGC ACC CGG ATA CAG C)

RPS13-Primer antisense, 1441

(TIB Molbiol: 5'- ATA ATA TCG AGC CAA ACG GTG AAT)

RPS13-Primer sense, 1441

(TIB Molbiol : 5'- TGA CGA CGT GAA GGA GCA GA)

Heat shock prot.-Primer antisense, 1454

(TIB Molbiol: 5'- AGT GCA CGT TAC CCC AAT CTG)

Heat shock prot.-Primer sense, 1454

(TIB Molbiol : 5'- AAA CTG CGC TCC TGT CTT CTG)

L-selectin-Primer antisense, 1466

(TIB Molbiol: 5'- CTG GGG GTT GAG GGA TAA ATG AG)

L-selectin-Primer sense, 1466

(TIB Molbiol : 5'- CAT ATT AAA TCG CCC TTG GTG AAA)

Diff48-Primer antisense, 1469

(TIB Molbiol: 5'- CGT GCA AAG CCA GCC AGA CC)

Diff48-Primer sense, 1469

(TIB Molbiol : 5'- CCC CAA AGA GCC TCA GCC TAA AAG)

Metalloprotease-Primer antisense, 1470

(TIB Molbiol: 5'- AGG CAG GTC GCA CTC ATC TTT TG)

Metalloprotease-Primer sense, 1470

(TIB Molbiol : 5'- TGT TGG CGT TGT TCA GGA)

Advantage PCR Cloning Kit (Clontech, Nr.: K1901-1)

Agarose (Sigma, Nr.: A-9539)

Aktin Primer antisense

(TIB Molbiol: 5'- AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG)

Aktin Primer sense

(TIB Molbiol: 5'- CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT)

Ampicillin (Sigma, Nr.: A9393)

AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer, Nr.: N808-0038)

Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, DIG Kit, Nr.: 1 093 274)

Aqua dest. (Sigma, Aqua B. Braun)

Blocking Lösung (Roche, DIG Kit, Nr.: 1 096 176)

CD20-Primer antisense

(TIB Molbiol: 5'- GGA TTC CTG ATC TTG GGG AGG TTC)

CD20-Primer sense

(TIB Molbiol : 5'- AGA GCT CAC ACA CCA TAT ATT AAC)

CD5-Primer sense

(TIB Molbiol : 5'- CAG GCA CGG TGG CAA GCA TCA TC)

CD5-Primer antisense

(TIB Molbiol: 5'-TGG CCG GGG TAG AAA TAG GGA CAT)

cDNA Subtraktion Kit (Clontech, Nr. : K1804-1)

Chloroform (Sigma, Nr. : C-2432)

DETAChAbeAD CD 19 (DynaI, Nr. : 125.05/06)

DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Nr.: 1 175 033)

DIG Wasch und Block Puffer Set (Boehringer Mannheim, Nr.: 1585 762)

DNA Mass Leiter (GibcoBRL, Nr.: 10496-016)

Dynabeads M-450 CD 19 (DynaI, Nr.: 111.03/04)

EDTA (Sigma, Nr.: E-5134)

Essigsäure (Merck, Nr.: 109944)

Ethanol absolut (Sigma, Nr.: E2385)

Ethidiumbromid (Sigma, Nr.: E-1510 )

Ficoll (Sigma, Nr.: F-2637)  
Formaldehyd (Sigma, Nr.: F 8775)  
Fötale Kälberserum (FKS) (Gibco BRL, Nr.: 10270-106 )  
G3PDH 3'Primer  
(TIB Molbiol: 5´- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA)  
G3PDH 5'Primer  
(TIB Molbiol: 5´- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC)  
Glucose (Sigma, Nr.: G-5400)  
Glycerol (Sigma, Nr.: G-5516)  
Hefe Extrakt (Difco Laboratories, Nr.: 0127-17-9)  
Hybridisierungsbeutel (Boehringer Mannheim, Nr.: 1666 649)  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Nr.: P5379)  
Kanamycin (Gibco BRL, Nr.: 11815-024)  
KCl (Merck, Nr.: 4936.1000)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Nr.: 4873.1000)  
Maleinsäure Puffer (Boehringer Mannheim, DIG Set)  
MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Nr.: A00053)  
Menschliche Plazenta DNA (Sigma, Nr.: D4642)  
MgCl<sub>2</sub> ·6H<sub>2</sub>O (Sigma, Nr.: M-9272)  
MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Gibco BRL, Nr. : 18064-014)  
NaCl (Merck, Nr.: 6404.5000)  
n-Butanol (Sigma, Nr.: 15,467-9)  
NucleoTrap Nucleic Acid Purification Kit (Clontech, Nr.: PR93584)  
NucleoTrapPCR Suspension (Clontech, NucleoTrap, Nr.: 4080-1)  
Nylonmembran, positiv geladen (Boehringer Mannheim, Nr.: 1209 299)  
Penicillin – Streptomycin Lösung (Biochrom KG, Nr.: A 2213)  
Pellet Paint (Novagen, Nr.: 69049-3)  
Phenol (GibcoBRL, Nr.: 5509 UA/UB/UC)b  
Phenol:Chloroform:Isoamyl (Sigma, Nr.: P-2069)  
Potassium Buffered Saline (PBS) (Gibco BRL, Nr.: 14200-067 )  
Random Hexamere Primer (GibcoBRL, Nr.: 48190-011)  
Red-Taq DNA Polymerase (Sigma, Nr.: D-5684)  
Red-Taq PCR Puffer (Sigma, Nr.: B-5926)  
Reverse Transcriptase (Boehringer Mannheim, Nr.: 1062 603)  
RNA freies Wasser (Sigma, Nr.: W-4502)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nr.: 1.005193)

Rneasy Mini Spin Säulen (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

RPMI Medium (Gibco BRL, Nr.: 21875-034)

SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech, Nr.: K-1052-1)

Sodium Pyruvat (Gibco BRL, Nr.: 11360-039)

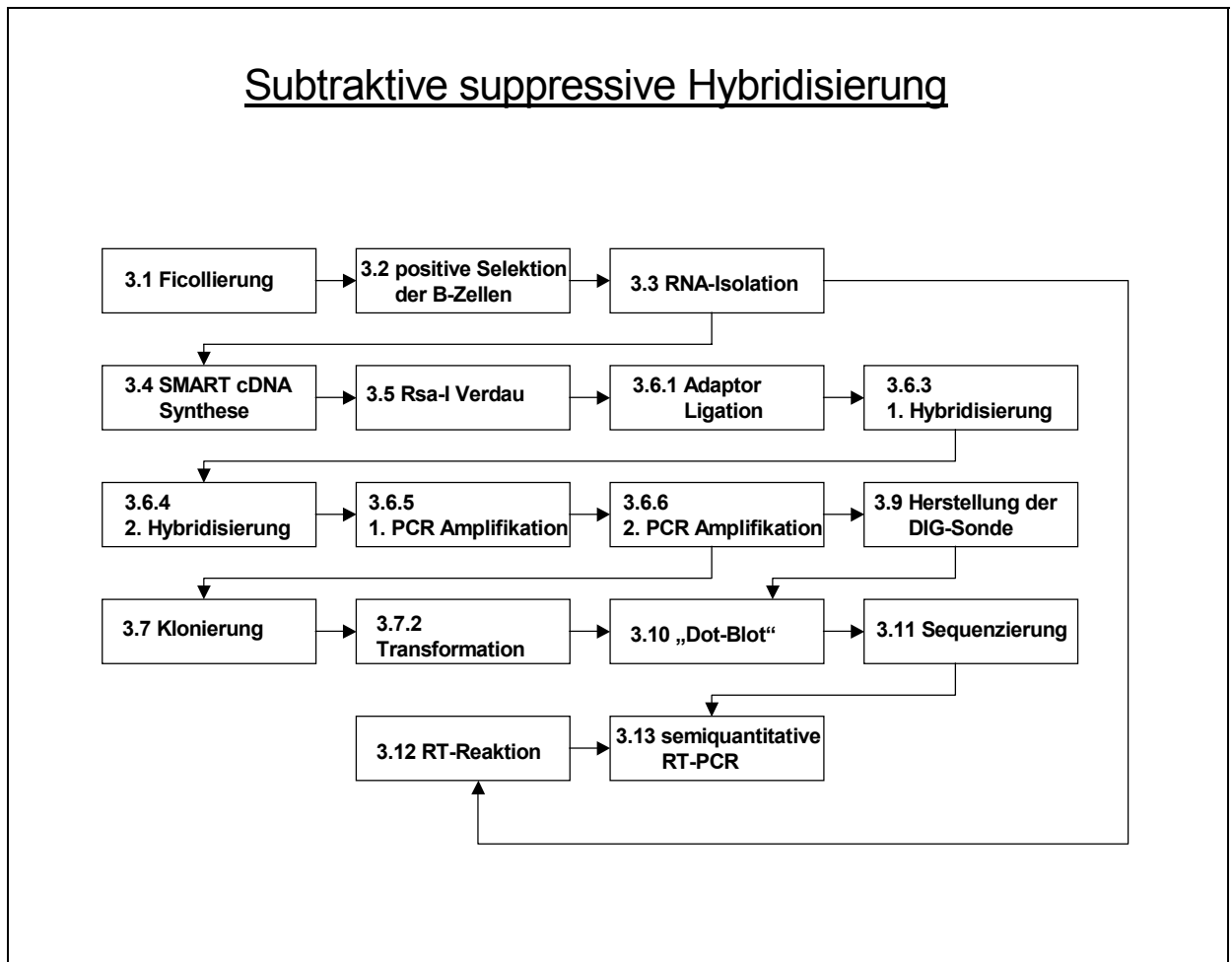
Trizma Base (Sigma, Nr.: T-8524)

Trypan blue (Biochrom KG, Nr.: L 6323)

Tryptone (Difco Laboratories, Nr.: 0123-17-3)

Wasch Puffer (Boehringer Mannheim, DIG Set)

### 3 Methoden



#### 3.1 Ficollierung der Blutprobe

Die verwendeten Blutproben wurden aus dem peripheren Blut von CLL-Patienten und Normalspendern gewonnen. Diese Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum, genehmigt. Die Entnahme der Proben erfolgte nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Spender.

*Prinzip:*

Die Ficollierung ist eine präparative Methode, bei der mononukleäre Zellen durch Dichtezentrifugation aufgetrennt werden. Zellen mit höherer Dichte, wie z.B. Erythrozyten wandern in die Ficoll-Phase, Zellen mit geringerer Dichte, B- und T-Lymphozyten, sammeln sich in der Interphase.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

Inaktiviertes Kälberserum (FKS)

Fötale Kälberserum (FKS)

Schüttelbad: 37 °C sowie 56 °C

Das FKS wurde bei 37 °C im Schüttelbad aufgetaut. Anschließend wurde das FKS bei 56 °C 30 Min. im Schüttelbad inkubiert, um das im Serum enthaltene Komplementsystem zu inaktivieren.

RPMI-Standard-Medium:

500 ml RPMI Medium

50 ml inaktiviertes FKS

5 ml Penicillin-Streptomycin Lösung

5 ml Natrium Pyruvat

Schüttelbad: 37 °C

50 ml des inaktivierten FKS und 5 ml der Penicillin-Streptomycin Lösung wurden bei 37°C im Schüttelbad aufgetaut, anschließend wurden die beiden Lösungen und 5 ml Natrium-Pyruvat in eine Steril-Filtrationseinheit überführt. Die sterilfiltrierte Lösung wurde in 500 ml RPMI Medium pipettiert.

*Durchführung:*

Die Blutproben der Patienten wurden im Verhältnis 1:2 und die der Normalspender 1:4 mit dem Zellkultur-Medium verdünnt.

Die mit Medium verdünnte Blutprobe wurde in Falconröhrchen vorsichtig auf das vorgelegte Ficoll (je 5 ml bei CLL- und je 15 ml bei Normalspender-Proben) aufgetragen.

Zentrifugation: 1500 RPM (500g), 4 °C, 30 Min.

Anschließend wurden die in der Interphase enthaltenen mononucleären Targetzellen aufgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Je Röhrchen wurden ca. 25 ml Interphase gesammelt und mit RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt.

Zentrifugation: 1500 RPM, 4 °C, 5 Min.

Waschvorgang: Die Überstände wurden abgesaugt und die pelletierten Zellen in 50 ml RPMI-Medium gepoolt sowie resuspendiert.

Zentrifugation: 1500 RPM, 4 °C, 5 Min.

Waschvorgang: Wiederholung des 1. Waschvorgangs.

Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet erneut in 50 ml RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde ein definiertes Volumen an Zellsuspension mit einer bestimmten Menge Trypan-blue-Lösung gefärbt und dann in eine Zählkammer überführt. Das Volumen wurde so gewählt, dass in einem Kleinquadrat der Zählkammer maximal 10 Zellen enthalten waren.

Aus dem eingesetzten Volumen an Zellsuspension ergibt sich der Verdünnungsfaktor (VF). Die Bestimmung der Zellzahl/ml setzt sich zusammen aus dem Mittelwert der gezählten Zellen pro Großquadrat (Z), dem Umrechnungsfaktor  $UF=10^4$  und dem Verdünnungsfaktor (VF). (V) stellt das Gesamtvolumen dar.

$$\text{Zellen/ml} = Z \times 10^4 \times \text{VF}$$

$$\text{Zellen/total (V ml)} = Z \times 10^4 \times \text{VF} \times V$$

### 3.2 Positivselektion der B-Lymphozyten mit Dynabeads M-450 CD19

#### *Prinzip:*

Dynabeads sind magnetische Partikel, an denen monoklonale Antikörper gebunden sind. Da CD19 das am häufigsten exprimierte Membranprotein von B-Lymphozyten ist, können diese durch Inkubation mit anti-CD19-Dynabeads aus Blut oder einer Zellsuspension über einen Magnetic Particle Concentrator (MPC) isoliert werden. DETACHaBEADs sind polyklonale Antikörper, die mit Fab-Fragmenten von monoklonalen Antikörpern reagieren. Werden DETACHaBEADs mit Dynabead CD 19 komplexierten B-Zellen inkubiert, binden die DETACHaBEADs an die Fab-Fragmente der CD 19 Antikörper und bewirken eine Dissoziation der Antigen-Antikörper-Bindung. Die hieraus resultierenden Dynabead-freien B-Zellen zeigen nach der Positivselektion mit den CD 19 positiven Dynabeads und der DETACHaBEAD-Behandlung keine veränderte Antigen-Expression auf der Zelloberfläche.

#### *Herstellung der Puffer / Medien:*

Inkubationspuffer-1 x PBS:

50 ml 10x PBS wurden in 450 ml Aqua dest. 1:10 verdünnt und anschließend mit Hilfe einer Sterilfiltrationseinheit sterilfiltriert.

Waschpuffer-2 % FKS in 1 x PBS:

50 ml 10x PBS und 10 ml inaktiviertes FKS wurden in 440 ml Aqua dest. gegeben und über eine Sterilfiltrationseinheit sterilfiltriert.

*Durchführung:*

Die Menge der eingesetzten Dynabeads richtete sich nach der geschätzten B-Zellkonzentration der jeweiligen Blutprobe.

Das Verhältnis von Dynabeads:Targetzellen betrug 4:1.

Für die Probe eines Normalspenders (Buffy coat) wurden 3% und für eine B-CLL Blutprobe 80% B-Zell-Anteil bestimmt.

Zunächst wurden die benötigten Dynabeads nach vorheriger Resuspension in ein FACS Röhrchen überführt und 2 Min. in den MPC (magnetischer Partikel-Konzentrator ) gestellt. Die magnetischen Partikel sammelten sich in Richtung des Magnetfeldes.

Die Dynabeads wurden mit Waschpuffer gewaschen, um das giftige Natrium-Azid zu entfernen.

Waschvorgang: Der Überstand wurde abgesaugt und das FACS-Röhrchen anschließend dem MPC entnommen. Die Dynabeads wurden in 3 ml Waschpuffer resuspendiert. Das Röhrchen wurde für 2 Min. in den MPC gestellt.

und 3. Waschvorgang: Wiederholung des 1. Waschgangs.

Die Dynabeads wurden dann in 3 ml Inkubationspuffer aufgenommen.

Die mononukleären Zellen wurden mit Inkubationspuffer gewaschen.

Ein definiertes Volumen Zellsuspension wurde nach vorheriger Resuspension entnommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit PBS auf 10 ml aufgefüllt.

Zentrifugation: 1500 RPM (500g), 4 °C, 5 Min.

Waschvorgang: Der zellfreie Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert.

Zentrifugation: 1500 RPM, 4 °C, 5 Min.

Waschvorgang: Wiederholung des 1. Waschvorgangs.

Danach wurden die Zellen in 3 ml PBS aufgenommen.

Daraufhin folgt die Inkubation der B-Lymphozyten mit den Dynabeads.

ml der gewaschenen Dynabeads und 3 ml der Zellsuspension wurden mit dem definierten PBS-Volumen in einem Gefäß verdünnt.

Die Röhrrchen wurden in einen Dynal-Mixer überführt und bei langsamer Rotation 30 Min im Kühlschrank (4°C) inkubiert.

Danach wurden die positivselektionierten B-Lymphozyten gewaschen, um die Dynabead-komplexierten Targetzellen von den übrigen mononucleären Zellen über den MPC zu trennen. Die gebildeten magnetischen Komplexe lagern sich an den MPC an und können so von den anderen Bestandteilen in der Zellsuspension getrennt werden.

Inkubationsröhrrchen 4 Min. in den MPC.

Waschvorgang: Je 2 Zellpellets wurden in 3 ml Waschpuffer gepoolt und in ein FACS Röhrrchen überführt. Daraufhin wurden die Proben 2 Min. in den MPC gestellt.

Waschvorgang: Der Überstand wurde abgesaugt, das FACS Röhrrchen entnommen und das Zellpellet in 3 ml Waschpuffer aufgenommen. Dann 2 Min. MPC.

3.-5. Waschvorgang: Wiederholung des 2. Waschvorgangs.

Um die Reinheit der B-Lymphozyten bestimmen zu können, müssen die magnetischen Dynabeads von den komplexierten B-Zellen gelöst werden. Hierfür wurden sie mit mit DETACHaBEADs inkubiert.

Die Dynabead-komplexierten B-Zellen wurden in einem definierten Volumen RPMI-Medium und DETACHaBEADs gepoolt.

Inkubation: Schüttler (Geschwindigkeit: 350) bei Raumtemperatur für 45 Min.

Danach folgten wiederum Waschvorgänge, wobei diesmal die Überstände die B-Lymphozyten enthielten und die mit DETACHaBEAD inkubierten Dynabead-Komplexe sich an den MPC anlagerten.

Waschvorgang der Dynabeads: Dynabeads wurden in 2 ml Medium resuspendiert. Das Röhrrchen wurde 2 Min. in den MPC gestellt und die Überstände in ein 15 ml Röhrrchen gepoolt.

Die Zellsuspension wurde mit Medium auf 14 ml aufgefüllt.

Zentrifugation: 1500 RPM (500 g), 4 °C, 5 Min.

Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in einem geeigneten Volumen Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Nach der Positivselektion der B-Zellen und der DETACHaBEAD-Behandlung wurde die Reinheit der isolierten Targetzellen über das FACScan ermittelt.

Die isolierten B-Zellen wurden mit CD5- und CD19-Antikörpern phänotypisiert, weiterhin wurde die Ausgangszellsuspension getestet, um sicher zu gehen, dass es sich in der Tat um eine pathogene bzw. normale Blutprobe handelte.

Für die Phänotypisierung wurden folgende Anikörper eingesetzt:

### 3.3 Isolierung der Total-RNA aus den isolierten B-Lymphozyten

*Prinzip:*

Blutprobe	Antikörper-Ansatz	eingesetzte Zellzahl
1. Isolierte B-Lymphozyten nach Positivselektion mit CD 19 positiven Dynabeads und nach DETACHaBEAD-Behandlung 2. Mononucleäre Ausgangszellsuspension	1. Negativkontrolle: ohne Antikörper 2. CD3-FITC + CD19 PE 3. CD5-FITC + CD19 PE 4. CD5-FITC + CD20 PE	$\Sigma 2 \times 10^6$

Nach der Isolierung der B-Lymphozyten aus einer pathogenen B-CLL- bzw. einer normalen Blutprobe wurde die Total-RNA aus den Zellen isoliert. Hierfür wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst in RLT-Lysepuffer aufgenommen und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Total-RNA Isolation erfolgte meist erst am nächsten Tag.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

RLT-Lysepuffer:

Der RLT-Lysepuffer aus dem Kit mußte mit Mercaptoethanol versetzt werden.

10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol wurden in 1 ml RLT-Lysepuffer gelöst.

*Durchführung:*

Die isolierten B-Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Dafür wurden die Zellen auf Falcon-Röhrchen verteilt und mit PBS auf 14 ml aufgefüllt.

Zentrifugation: 1500 RPM, 4 °C, 5 Min.

Waschvorgang: Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert.

Zentrifugation: 1500 RPM, 4 °C, 5 Min.

Anschließend wurden die auf Eis gelagerten Zellen in RLT-Lysepuffer aufgenommen.

Das Zellpellet wurde durch mehrfaches Anschneiden resuspendiert, anschließend wurden x µl RLT-Puffer zugegeben.

Die im Lysepuffer aufgenommenen Zellen werden mittels einer Kanüle homogenisiert, dabei wird die Suspension über eine 2 ml Spritze gesaugt.

Danach wurden die Zellysate bei -80 °C eingefroren.

### **3.4 SMART PCR cDNA-Synthese**

*Prinzip:*

Mit Hilfe der SMART Technologie ist es möglich, RNA in Form von cDNA zu vervielfältigen. Die Methode wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet, da das Ausgangsmaterial für die Isolierung der RNA aus B-Lymphozyten auf 20 ml Blut je Patient limitiert war.

Im Verlauf der SMART PCR cDNA Synthese wurde die RNA zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden modifizierte Oligo(dT)-Primer (CDS-Primer) eingesetzt, die am 5'-Ende des Primers SMART spezifische Oligonukleotide, sogenannte Adaptern, trugen. Beim Erreichen des 5' Endes der RNA fügte die reverse Transkriptase einige Oligo(dC)-Nukleotide an das 3' Ende der neugebildeten cDNA an. Hierbei lagerten sich an die Oligo(dC)-Sequenzen des cDNA-Stranges zusätzliche SMART-Adaptern (SMART-II-Oligonukleotide) über die Oligo(dG)-Sequenzen an und bildeten nach Abschluß der reversen Transkriptase-Reaktion das 3' Ende der cDNA-Moleküle. Als Produkt dieser modifizierten reversen Transkriptase-Reaktion lagen einzelsträngige cDNAs vor, die an den 5' und 3' Enden SMART-spezifische Adaptersequenzen trugen. In der anschließenden SMART PCR

cDNA Synthese wurden die cDNA Moleküle mit Hilfe geeigneter SMART-Primer vervielfältigt.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

1x SMART-TE Puffer (pH 7,6)

10mM Tris, pH 7,6

1 mM EDTA

50x TAE-Puffer

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O

Ein Liter Aqua dest. wurde hinzugegeben.

*Durchführung:*

RNA-Probe (0,05 – 1 µg Total-RNA)	1 – 3 µl
CDNA Synthesis (CDS)-Primer (10 µM)	1 µl
SMART II Oligonukleotide (10 µM)	1 µl
A. dest	x µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	5 µl

Bestandteile wurden gemischt und abzentrifugiert.

Inkubation bei 70 °C für 2 Min.

5 x First-strand Puffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
50 x dNTP	1 µl
MMLV RT	1 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Je 5 µl vom Mastermix wurden auf jede Probe gegeben.

Inkubation bei 42 °C für eine Stunde.

Bei einer eingesetzten Menge von 1 µg Total-RNA wurde nach der einstündigen Inkubation der RT-Ansatz durch Zugabe von 40 µl TE-Puffer 1:5 verdünnt.

Die RT-Reaktion wurde anschließend durch Inkubation bei 72 ° C für 7 Min. abgestoppt.

Nach der SMART-RT-Reaktion erfolgte die SMART-PCR. Hiefür wurden Adaptor-spezifische Primer eingesetzt (PCR Primer).

Master-Mix:

Megohm-Wasser	74 µl
10x advantage PCR Puffer	10 µl
50x dNTP (10 mM )	2 µl
PCR Primer ( 10 mM )	2 µl
50x Advantage Polymerase Mix	2 µl
Gesamtvolumen	90 µl

Bei einer Ausgangsmenge von 1 µg Total-RNA wurden 1 µl ss cDNA aus dem RT-Ansatz in die PCR eingesetzt.

Das Volumen wurde auf 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 90 µl Master- Mix vermengt.

Für jede cDNA Probe wurde ein Dreifachansatz angesetzt.

Die Proben wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

PCR-PE 480

1 x	95 °C	60 Sek.
15x	95 °C	15 Sek.
	65 °C	30 Sek.
	68 °C	6 Min.

Nach 15 Zyklen wurden je cDNA-Probe zwei Ansätze auf Eis gelagert.

Mit dem 3. Ansatz wurde die optimale Zyklenzahl für jede cDNA-Probe ermittelt.

Hierfür wurden aus diesem Ansatz zunächst 10 µl entnommen und auf Eis gestellt.

Der Rest der Probe wurde erneut in den PCR-Cycler gestellt und allen 3 Zyklen wurden jeweils 10 µl entnommen.

Die gesammelten PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,2 % EtBR-Agarose-Gel aufgetrennt und die optimale Zyklenzahl bestimmt, bei der die amplifizierte cDNA einen Schmier im Bereich von 0,5-6 kB ergab.

Basierend auf diesen Daten wurden je cDNA-Probe die 2 restlichen auf Eis gelagerten PCR-Ansätze erneut in den PCR-Cycler überführt und entsprechend der optimalen Zyklenzahl weiteramplifiziert.

Durch Zugabe von je 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt.

### 3.5 Reinigung und Verdau der ds cDNA

*Prinzip:*

Die PCR-Produkte wurden mittels Säulen-Chromatographie gereinigt (SMART PCR cDNA-Synthesis-Kit) und anschließend mit Rsa-I verdaut (PCR-Select cDNA-Subtraction-Kit). Durch den Verdau wurden die SMART-Oligonukleotide abgetrennt, da diese eine Rsa-I Schnittstelle tragen.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

1x TNE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM NaCl

0,1 mM EDTA

50x TAE-Puffer (siehe 3.4)

TE-Puffer (pH 8,0)

10mM Tris-Base

1mM EDTA

*Durchführung :*

Volumenbestimmung der PCR-Produkte aus 3.4.

Zugabe eines gleichen Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1).

Zentrifugation: 14000 RPM, 10 Min., RT.

Die obere Phase wurde abgenommen, und 3,5x die Menge an DNA n-Butanol hinzugegeben.

Zentrifugation: 14000 RPM, 1 Min.

In die CHROMA-SPIN-Säulen wurden 1,5 ml 1x TNE gegeben.

Danach wurde die Probe aufgetragen.

Zugabe von 25  $\mu$ l 1x TNE, dann 150  $\mu$ l 1x TNE, und 320  $\mu$ l 1x TNE.

Die Eluate wurden gesammelt und eine Probe mittels 1,2% Etbr-Agarose elektrophoretisch aufgetrennt.

10x Rsa-I-Restriktionspuffer

36  $\mu$ l

Rsa-I 1,5 µl

Inkubation bei 37 °C, 3 Stunden.

Vor dem Verdau wurde eine Probe entnommen und mit einer Probe nach dem Verdau verglichen mittels 1,2% EtBr-Gelelektrophorese.

Es folgte erneut eine Aufreinigung. Dazu wurde der NucleoTrap-Purification-Kit angewandt.

Vor dem Start musste dem NT 3 Puffer 95 % Ethanol hinzugefügt werden.

Dann wurde das Volumen aus dem Verdau bestimmt.

Zugabe des 4-fachen Volumens NT2-Puffer.

Die Proben wurden 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Zentrifugation: 14000 RPM 30 Sek., RT.

Zugabe des definierten NT2-Puffer Volumens.

Zentrifugation: 14000 RPM 30 Sek., RT.

Zugabe von 4-fachen Volumen NT3-Puffer.

Zentrifugation: 14000 RPM 30 Sek., RT.

Der letzte Schritt wurde wiederholt und die Proben 15 Min. an der Luft getrocknet.

50 µl TE Puffer wurden hinzugegeben.

Inkubation bei 50 °C für 5 Min. und danach Zentrifugation: 14000 RPM 30 Sek., RT.

Der Überstand enthielt die DNA Fragmente.

Danach wurde die DNA-Konzentration im Photometer bestimmt.

DNA-Konzentration =  $OD_{260} \times UF \times VF$ .

der UF (Umrechnungsfaktor) = 50.

VF (Verdünnungsfaktor) = musste aus der Verdünnung errechnet werden.

### 3.6 Subtraktive suppressive Hybridisierung

#### Prinzip:

Im Rahmen der subtraktiven Hybridisierung von 2 cDNA-Populationen wurden differentielle Gene im jeweils subtrahierten cDNA-Pool angereichert, die gegenüber der Subtraktor-cDNA hochreguliert waren. Die cDNA, die differentielle Gene enthält, wurde als „Tester“ bezeichnet und die Subtraktor-cDNA als „Driver“.

Für die PCR-gestützte subtraktive Hybridisierung (Suppression Subtractive Hybridization-SSH) wurde der PCR-Select-Subtraction-Kit der Firma Clontech eingesetzt. Hierbei wurde zunächst die Tester-cDNA geteilt (Tester 1 bzw. Tester 2) und mit 2 verschiedenen Adaptoren ligiert. Bei der 1. (subtraktiven) Hybridisierung wurden die (Hitze-denaturierten, einzelsträngigen) cDNAs von Tester 1 bzw. Tester 2 unabhängig voneinander mit im Überschuß zugesetzter (einzelsträngiger) Driver-cDNA hybridisiert. Im Verlauf dieser 1. Hybridisierung wurden die nicht-differentiellen Tester cDNA-Moleküle, die sowohl im Tester als auch im Driver enthalten waren, vom Driver abgefangen. Die übrigbleibenden einzelsträngigen Adaptor-tragenden Tester-Moleküle repräsentierten die differentiellen Target-cDNAs. Bei der 2. (subtraktiven) Hybridisierung wurden die Tester 1- und Tester 2-Fraktionen vereinigt und wiederholt mit im Überschuss zugesetztem Driver hybridisiert. Die hierbei (u.a.) entstandenen Tester-Hybride, die an den Enden unterschiedliche Adaptoren trugen, repräsentierten die differentiellen Target-cDNAs, denn nur diese wurden in der anschließenden suppressiven PCR über Adaptor-spezifische Primer exponentiell amplifiziert.

### 3.6.1 Adaptor Ligation

*Prinzip:*

Herstellung der mit zwei verschiedenen Adaptoren ligierten Tester-Populationen.

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	3 µl
5x Ligations Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	6 µl

	Tester 1	Tester 2
Verdünnte Tester cDNA	2 µl	2 µl
Adaptor 1 ( 10 µM )	2 µl	-
Adaptor 2R ( 10 µM )	-	2 µl
Mastermix	6 µl	6 µl
Gesamtvolumen	10 µl	10 µl

Dieser Ansatz wurde über Nacht (16 Stunden) bei 16 °C inkubiert.

Die Ligation wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA/Glycogen Mix gestoppt und bei 72 °C für 5 Min. inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren.

### 3.6.2 Ligations Kontrolle

*Prinzip:*

Bei der Ligations Kontrolle wurde überprüft, ob mindestens 25 % der cDNA Adaptoren gebunden haben. Hierbei wurde semiquantitativ die Anzahl der GAPDH-Fragmente, die mit einem Adaptor ligiert wurden, mit der Gesamtzahl der GAPDH-Fragmente verglichen.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

50x TAE – Puffer (siehe 3.4)

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	18,5 µl
10x PCR Puffer	2,5 µl
dNTP Mix	0,5 µl
50x Adv. Polymerase Mix	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>22 µl</b>

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Tester 1	1 µl	1 µl	-	-
Tester 2	-	-	1 µl	1 µl
GAPDH 3'	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
GAPDH 5'	-	1 µl	-	1 µl
PCR-Primer	1 µl	-	1 µl	-

22 µl Master-Mix wurde zu jedem Ansatz hinzugegeben.

50 µl Mineralöl wurden auf die Proben überschichtet.

Inkubation bei 75 °C für 5 Min.

PCR PE 480 , 30 Zyklen

94 °C      30 Sek.

65 °C      30 Sek.

68 °C      2,5 Min.

Danach wurden die PCR-Produkte in einem 2%-Agarose-Gel aufgetrennt und die cDNA-Mengen miteinander verglichen.

### 3.6.3 Erste Hybridisierung

*Prinzip:*

In der ersten Hybridisierung wurden die adaptorligierten Tester-cDNA-Fragmente mit überschüssiger Driver-cDNA hybridisiert. Dabei wurden alle Tester-Fragmente, die auch in der Driver-Population vorkommen, im Idealfall abgebunden. Nur Tester-Fragmente, die keine oder zu wenige Entsprechungssequenzen im überschüssigen Driver fanden, blieben einzelsträngig.

*Durchführung:*

	Hybridisierungsprobe 1	Hybridisierungsprobe 2
Driver cDNA	1,5 µl	1,5 µl
Tester 1	1,5 µl	-
Tester 2	-	1,5 µl
4x Hybridisierungspuffer	1 µl	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>4 µl</b>	<b>4 µl</b>

25 µl Mineralöl wurden auf jede Probe gegeben.  
 Inkubation bei 98 °C für 1,5 Min. und bei 68 °C für acht Stunden.

### 3.6.4 Zweite Hybridisierung

6 *Prinzip:*

6 Im Ergebnis der ersten Hybridisierung waren nun in den beiden Proben nur noch DNA-Fragmente einzelsträngig, die nicht vom Driver abgesättigt worden waren. Diese Fragmente wurden dann in der zweiten Hybridisierung zu Konstrukten hybridisiert, die zwei verschiedene Adapter an ihren Enden trugen. Diese waren in den nachfolgenden PCR-Reaktionen die einzigen, die amplifiziert werden konnten.

6 Durchführung:

- 6 Es wurde neue Driver-cDNA angesetzt und 1  $\mu\text{l}$  mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet.
- 6 Inkubation bei 98 °C 1,5 Min.
- 6 Dann erfolgte eine gleichzeitige Mischung von Tester und Driver, indem die Hybridisierungslösung 2 mit einer Pipette und etwas Luft angesogen wurde, dann wurde 1  $\mu\text{l}$  frische Driver-cDNA in die gleiche Pipette aufgenommen und dann der gesamte Inhalt über die Hybridisierungslösung 1 gegeben und vermischt.
- 6 Inkubation über Nacht (16 Stunden) bei 68 °C.
- 6 Die Reaktion wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Dilutionspuffer gestoppt und 7 Min. bei 68 °C inkubiert.

### 3.6.5 Erste Suppressive PCR

*Prinzip:*

Im Verlauf der suppressiven PCR wurden die differentiell exprimierten Gen-Fragmente, die an den Enden unterschiedliche Adaptoren trugen, angereichert.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

50x TAE-Puffer (siehe 3.4)

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	19,5 $\mu\text{l}$
10x PCR-Reaktions-Puffer	2,5 $\mu\text{l}$
dNTP Mix	0,5 $\mu\text{l}$
PCR Primer 1	1 $\mu\text{l}$
50x Adv. CDNA Polymerase Mix	0,5 $\mu\text{l}$
<hr/>	
Gesamtvolumen	24 $\mu\text{l}$

Je 24  $\mu\text{l}$  des Master-Mix wurden mit 1  $\mu\text{l}$  verdünnter cDNA aus der 2. Hybridisierung vermengt.

Mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

Min. Inkubation bei 75 °C.

PCR PE 480

94 °C        30 Sek.

66 °C        30 Sek.

72 °C        1,5 Min.

Anschließend wurden die Proben in einer 2%-EtBr-Agarose- Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 3.6.6 Zweite suppressive PCR nach dem Nested-Prinzip

*Prinzip:*

Die 2. (nested) suppressive PCR diente dazu, unspezifische Amplifikationen zu reduzieren und differentielle Sequenzen anzureichern. Nested-Primer setzten weiter innerhalb in der Sequenz an und ermöglichten so eine spezifischere Amplifikation.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

50x TAE-Puffer (siehe 3.4)

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	18,5 µl
10x PCR Reaktionspuffer	2,5 µl
Nested PCR Primer 1	1 µl
Nested PCR Primer 2R	1 µl
dNTP Mix	0,5 µl
50x Adv. Polymerase Mix	0,5 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	24 µl

24 µl Master-Mix wurden mit 1 µl des 1. PCR Produktes vermengt.

50 µl Mineralöl wurden hinzugegeben.

PCR PE 480

94 °C        30 Sek.

68 °C        30 Sek.

72 °C      1,5 Min.

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese mit einem 2%-EtBr-Agarose-Gel durchgeführt.

### 3.6.7 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

*Prinzip:*

Die Effizienz der Subtraktion wurde überprüft, indem die Menge an unsubtrahierter und subtrahierter cDNA verglichen wurde. Dazu wurde das GAPDH-Gen (Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) angewendet, welches bekanntermaßen in den zu vergleichenden Zellen gleichstark exprimiert.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

50x TAE-Puffer (siehe 3.4)

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	22,4 µl
10x PCR Peaktions Puffer	3 µl
dNTP Mix	0,6 µl
GAPDH 3'-antisense	1,2 µl
GAPDH 5'-sense	1,2 µl
50x Adv. Polymerase Mix	0,6 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	29 µl

Die subtrahierten und unsubtrahierten Proben wurden 1:10 verdünnt und mit dem Master-Mix vermengt und mit 25 µl Mineralöl überschichtet.

PCR PE 480, 33 Zyklen

94 °C      30 Sek.

60 °C      30 Sek.

68 °C      2 Min.

Bei Zykluszahl 18, 23, 28, 33 wurden jeweils 5 µl abgenommen.

anschließend wurde eine Gelelektrophorese mit einem 2 % EtBr-Agarose- Gel durchgeführt.

### 3.7 Klonierung

#### *Prinzip:*

Mit dieser Methode können PCR-Produkte kloniert werden.

Für die Klonierung der PCR Produkte wurde der Advantage-PCR-Cloning-Kit von der Firma Clontech angewendet. Im Kit war ein pT-Adv-Vektor vorhanden, der am 3' Ende mehrere Tyrosinnukleotide besaß. Da in den vorherigen PCR durch die Polymerasen Adenosinnukleotide an die Enden der PCR-Produkte angehängen wurden, ließen sich diese in den „multiplen Kloning-Platz“ des pT-Adv-Vektor überführen. Ein lacZa-Gen gab durch eine blau/weiß-Färbung der Kolonien Aufschluß über die positive Klonierung.

#### *Herstellung der Puffer / Medien:*

##### LB (Luria-Bertani) medium (pH 7,0)

1,0 % Bakto-Trypton	10 g
0,5 % Hefe-Extrakt	5 g
1,0 % NaCl	10 g

In 950 ml Aqua dest. auflösen, und pH wurde mit 5 M NaOH eingestellt.

##### LB/antibiotische Platten:

100 ml des LB Mediums wurden mit 1,5 g Agar vermengt, autoklaviert.

50 µg/ml Kanamycin wurden hinzugegeben und in 10-cm Platten gegeben.

##### X-Gal Lösung:

400 mg X-Gal wurden in 10 ml Dimethylformamid aufgelöst.

##### IPTG-Lösung:

238 mg IPTG wurden in 10 ml Aqua dest. aufgelöst.

##### LB/X-GAL/IPTG Platten:

die Platten wurden bei 37 °C für 10 Min. aufgewärmt.

40 µl X-GAL Lösung und 40 µl IPTG-Lösung wurden auf die Platten aufgetragen.

Inkubation der Platten bei 37 °C 30 Min.

SOC Medium:

2% Trypton, 0,5 % Hefe Extrakt, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

20mM Glukose

„Terrific broth“

1,2 % Trypton, 2,4 % Hefe Extrakt, 0,4 % Glycerol

17mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.7.1 Klonierung der subtrahierten cDNA in den pT-Adv-Vektor

*Durchführung:*

Die Menge an eingesetztem PCR Produkt errechnete sich nach folgender Formel:

$x \text{ ng PCR Produkt} = (y \text{ bp PCR Produkt}) (50 \text{ ng pT-Adv})$

---

(size of pT-Adv: ~3 900 bp)

PCR Produkt	x µl
10x Ligations Puffer	1 µl
pT-Adv-Vektor	2 µl
Megohm-Wasser	x µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

---

Inkubation bei 14 °C über Nacht.

### 3.7.2 Transformation

*Durchführung:*

µl 0,5 M β-ME wurden mit den TOP10F' kompetenten Zellen vermengt und je 2 µl der Ligations Lösung hinzugegeben.

Inkubation auf Eis für 30 Min.

Danach Hitze-Schock für genau 30 Sek. in 42 °C Wasserbad.

Dann folgte eine Lagerung auf Eis für 2 Min.

250 µl SOC Medium wurden dazugegeben.

Inkubation bei 37 °C für eine Stunde im Schüttler.

Je 50 µl und 200 µl wurden auf die LB/X-GAL/IPTG Platten gegeben.

Inkubation bei 37 °C für 18 Stunden.

### 3.8 Kolonie-PCR

#### *Prinzip:*

Wie bereits erwähnt, gab ein lacZa-Gen in den TOP10F' kompetenten Zellen durch eine blau/weiß-Färbung der Kolonien Aufschluß über die positive Klonierung.

Daher wurden nach der Transformierung die weißen Kolonien aufgenommen und weiterverarbeitet. Für die Amplifikation der Inserts wurden M13 Primer eingesetzt, die den „multiplen Kloning-Platz“ flankierten.

#### *Durchführung:*

##### Master-Mix:

Megohm-Wasser	22,25 µl
10x PCR-Puffer	4,5 µl
dNTP	1 µl
M13.7 Primer	1 µl
M13.8 Primer	1 µl
Adv. Polymerase Mix	0,25 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	30 µl

Je 200 µl LB-Medium wurden in ein 96-well Mikrotiter Platte vorgelegt und je ein Klon gepickt und überführt.

Inkubation für 4 Stunden bei RT.

Ansatz (Verdünnung der Bakteriensuspension):

Aqua dest., Medium, Bakteriensuspension	5 µl
Megohm-Wasser	50 µl

PCR-Ansatz:

verdünnte Bakteriensuspension	15 µl
Master-Mix	30 µl
PCR PE 9700, 35 Zyklen	
1. 94 °C	10 Min.
2. 94 °C	1 Min.
70 °C	1 Min.
72 °C	1 Min.
3. 72 °C	10 Min.

### 3.9 Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA

*Prinzip:*

Digoxigenin ist eine nicht radioaktive Methode, DNA zu markieren. In einer PCR wurde Digoxigenin-UTP in die cDNA eingebaut, danach mit Anti-Digoxigenin Antikörpern markiert und in einem weiteren Schritt mit chemilumineszenten Substraten angefärbt. Der DIG-System-Guide für Filter-Hybridisation der Firma Roche wurde als Protokoll angewendet.

*Puffer/Medium:*

TE-Puffer (siehe 3.

*Durchführung:*

Master-Mix:

Megohm-Wasser	18,5 µl
10x PCR Puffer	2,5 µl
Nested 1 Primer	1 µl
Nested 2R Primer	1 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
50x Adv. Polymerase Mix	0,5 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	24 µl

Wiederholung der Durchführung der 2. Suppressiven PCR.

Daraufhin wurde die Konzentration der Dig-markierten cDNA bestimmt.

Folgende Formel wird angewandt:

SOLL: 300ng →20h→ 2000 ng

IST: x ng →20h→ y ng

Als Nächstes wurde eine Verdünnungsreihe mit Kontroll-Dig-cDNA und Dig-cDNA hergestellt.

Für die Kontroll cDNA wurden Endkonzentrationen von 1ng/μl bis 0.01 pg/μl vorgegeben.

Je 1 μl der Proben wurden auf eine Nylon-Membran aufgetragen.

„Auto-crosslink“: 2x.

1x Waschen: 50 ml, 1 Min.

1x Blockierlösung: 100 ml, 30 Min.

Antikörper in Blockierlösung: 4 μl Antikörper und 20 ml Blockierlösung für 15 Min.

2x Waschen in 100 ml Waschpuffer, je 15 Min.

Detektion mit 200 μl NBT/BCIP und 10 ml Detektion-Lösung.

### **3.10 Nicht-radioaktiver „Dot-Blot“**

*Prinzip:*

Der „Dot-Blot“ wurde zur Überprüfung der SSH eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial dienten die Proben der Kolonie-PCR die im Verlauf mit der Dig-Sonde hybridisiert wurden.

*Herstellung der Puffer / Medien:*

TE-Puffer (siehe 3.5):

Wasch-, Blockier- und Detektionspuffer stammten aus dem DIG-Kit der Firma Roche.

*Durchführung:*

Die cDNA wurden mit NaOH denaturiert und je 1 μl der Proben auf eine Nylon Membran aufgetragen. Danach folgten diese Schritte:

Min. in Tris-HCl (0,5 M pH 7,5).

Waschen in Aqua B. Braun: 1 Min. 50 ml.

2 x „crosslinking“.

Inkubation mit Pre-Dig-Easy-Hybridisierungslösung für eine Stunde bei 37°C,  
10 ml / Behälter, Geschwindigkeit auf Schüttler: 50.

Inkubation mit Dig-cDNA (10ng/μl) Sonde für 16 Stunden bei 37°C.

2x Waschen mit 2x SSC/0,1% SDS, 5 Min. , 100 ml, RT.

2x Waschen mit 0.5 SSC/0,1% SDS, 15 Min. Wasserbad: 68°C.

Waschen mit Waschpuffer, 15 Min., 100 ml, RT.

Blockierung mit Blockier-Puffer, 30 Min., 100 ml.

20 ml Blockier-Puffer und 2 μl Anti-Dig Antikörper Inkubation 30 Min., RT.

2x Waschen mit Waschpuffer, 15 Min., 100 ml, RT.

Detektion mit NBT/BCIP für 16 Stunden bei Raumtemperatur im dunklen Raum.

### **3.11 Sequenzierung und Primer Design**

Die aufgrund des „Dot-Blot“ als differentiell erkannten cDNA-Klone wurden von Frau Dr. rer. nat. M. Wedde sequenziert und danach Primer mit DNASTar gebildet. Die Primer produzierte die Firma TIB MOL.

(Name und Sequenzen der Primer auf Seiten 12-13)

### **3.12 RT-Reaktion**

*Prinzip:*

Die RT-Reaktion wurde angewendet, um Total-RNA in cDNA umzuschreiben. Für die semiquantitative PCR wurde keine SMART cDNA benötigt.

*Durchführung:*

Master-Mix:

Total RNA	x µl entsprechend 1 g total RNA
RT-Puffer (5x)	4 µl
dNTP's (10mM)	1,3 µl
Random Hexamer Primer (100µM)	1 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
Megohm-Wasser	x µl
Rnasin (40 U/µl)	1 µl
RT-Enzym (Superscript, 200 U)	1 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 µl

Inkubation für 10 Min. bei 70 °C.

Ansätze wurden danach auf Eis gelegt und RNasin und RT-Enzym hinzugegeben.

Inkubation 10 Min. bei RT, eine Stunde bei 37 °C, 5 Min. bei 95 °C.

Danach wurden die Ansätze auf Eis gelegt.

### 3.13 Semiquantitative RT-PCR

*Prinzip:*

Die semiquantitative PCR stellte eine weitere Suchmethode dar.

Für die PCR musste erneut cDNA hergestellt werden, welche dann mit den Primern weiter untersucht werden konnte.

Master-Mix:

Megohm-Wasser	56,5 µl
Red-Taq PCR Puffer	10 µl
dNTP Mix (10mM)	2 µl
designter Primer-Mix	4 µl
Red-Taq Polymerase (1 U/µl)	2,5 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	75 µl

Ansatz:

cDNA Probe	25 µl
Master-Mix	75 µl

Mineralöl 25 µl

Die PCR wurden mit einem Hotstart im PE480 durchgeführt.

PCR, PE 480

94 °C 5 Min.

33 Zyklen:

94 °C 1 Min.

x °C (Annealing) 1 Min.

72 °C 1 Min

Primer	Annealing Temp. (x)	PCR - Zyklen
Aktin	55 °C	33
CD 5	60 °C	33
CD 20	60 °C	33
1416	60 °C	33
1421	55 °C	33
1427	55 °C	33
1428	60 °C	33
1433	60 °C	33
1438	65 °C	33
1441	60 °C	33
1454	60 °C	33
1466	60 °C	33
1469	60 °C	33
1470	65 °C	33

Bei Zyklus 21, 24, 27, 30 und 33 wurden gleiche Mengen an Probe (20 µl) entnommen und auf Eis gelagert.

Daraufhin wurden 2% EtBr-Agarose-Gele gegossen, und die Proben anhand der Zyklen aufsteigend pro Patient/Normalspender aufgetragen.

### 3.14 Foto-Dokumentation

Die Agarose-Gele wurden mit einem Positiv-Negativ-Film der Firma Polaroid in einem gleichbleibenden Abstand und gleicher Vergrößerung fotografiert und entwickelt.

Höhe der Kamera vs. UV-Licht: 66,5 cm.

Gelentfernung zum linken Rand des UV-Lichts: 5 cm.

Gelentfernung zum unteren Rand des UV-Lichts: 3 cm.

Belichtungszeit: 35 Sek.

Entwicklungszeit: 25 Sek.

### 3.15 Auswertung

Die Positiv-Negativ Filme wurden mit einem Durchlichtscanner und dem Programm Foto Look eingelesen. Mit dem Programm NIH-Image wurde der Hintergrund der Bilder subtrahiert. Daraufhin bestimmte das Programm den „Area x Mean“, also Fläche mal Dichte der einzelnen Banden. Diese Werte wurden in das Programm Microsoft Excel überführt.

Die Area x Mean-Werte wurden multipliziert und für jeden einzelnen Patienten addiert.

Patient	Area	Mean	AreaxMean
1. Bande	111	222	24642
2. Bande	333	444	147852
3. Bande	555	666	369630
<b>Ergebnis</b>			<b>542124</b>

Dieser Wert wurde durch die Summe der Marker-Banden dividiert, um Schwankungen innerhalb eines Fotos auszugleichen. Dieser Wert wurde wiederum durch einen Aktin- Wert, der ebenso für jeden Patienten/Normalspender vorher gemessen worden war, geteilt. Das Aktin-Gen war in allen zu untersuchenden Zellen in ähnlichen Konzentrationen vorhanden. Diese Methode glich Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Patienten und Normalspenders aus. Dadurch entstanden spezielle Werte, aus dem Graphiken erstellt werden konnten.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Etablierung einer differentiellen Genbank von normalen B-Lymphozyten bzw. malignen B-CLL-Zellen**

Für die Identifizierung von Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen, die für die Entstehung der chronisch lymphatischen Leukämie relevant sein könnten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei differentielle cDNA-Banken etabliert. Zur Erstellung einer cDNA-Genbank wurde die subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) als Methode eingesetzt, wobei gleiche cDNA-Sequenzen in den zu vergleichenden Populationen subtrahiert und differentielle Transkripte angereichert wurden. Die SSH startete mit der Aufarbeitung der Blutprobe, Selektion der B-Zellen, und Isolation von RNA aus den Zellen. Daraufhin erfolgte die Umschreibung in cDNA, subtraktive Hybridisierung der zu vergleichenden Proben und Amplifizierung der subtrahierten Transkripte. Die Proben wurden kloniert und mittels DotBlot und RT-PCR getestet.

Die Methode beinhaltete mehrere Kontrollschritte, die eine ständige Überprüfung der geleisteten Arbeit ermöglichten und somit einen erfolgreichen methodischen Ablauf garantierten. Aus Übersichtsgründen wurden exemplarisch Bilder von der Erstellung einer Genbank aufgeführt, in der gepoolte Proben von CLL-Patienten und gesunden Kontrollgruppen voneinander subtrahiert wurden. Als Ausgangsmaterial der Kontrollgruppen wurden sogenannte „Buffy coats“, d.h. mit Leukozyten angereicherte Restprodukte von gesunden Blutspendern, aufgearbeitet und mit Blut von CLL-Patienten verglichen. Als Kontrollgruppe musste das Blut von Blutspendern verwendet werden, da von anderen Normal Spendern nicht ausreichend viele B-Lymphozyten isolierbar waren.

#### **4.1.1 Isolierung der B-Zellen**

Für die Etablierung der differentiellen cDNA-Banken sowie für die nachfolgende Überprüfung der Differentialität der entdeckten Gene mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR wurden CD19-positive B-Zellen von Normal Spendern (n=10) sowie aus dem peripheren Blut von B-CLL-Patienten (n=11) mittels anti-CD19-gekoppelten Dynabeads isoliert. Nach der Positivselektion wurde die Reinheit der isolierten B-

Zellpopulationen über die Co-Expression von CD5 und CD19 bzw. CD20 mit Hilfe des FACScans bestimmt (Abb. 4.1, Tabelle 4.1), welche zwischen 96-98% lag. Darüber hinaus wurde die Ausbeute an gereinigten Zellen lichtmikroskopisch bestimmt.

Patient	Alter (im Jahr 2000)	Binet-Stadium	Geschlecht	Blutentnahmetag	Zellzahl nach B-Selektion	Reinheit
Pat. Le	68 J.	A	W	20.09.99	$2,1 \times 10^7$	98,8 %
Pat. Wö	72 J.	B	M	27.09.99	$1,3 \times 10^7$	99,27%
				28.02.00	$2,7 \times 10^7$	99,87
Pat. Bi	66 J.	B	M	23.02.00	$4,5 \times 10^7$	97 %
Pat. Lü *	74 J. †	C	W	02.03.99	$1,2 \times 10^7$	96,33%
Pat. Mü	58 J.	A	M	08.03.99	$1,6 \times 10^7$	98%
				17.01.00	$1,2 \times 10^6$	98%
Pat. Al	60 J.	B	M	08.03.99	$1,9 \times 10^7$	99,5%
Pat. Gr	60 J.	A	W	15.03.99	$4,3 \times 10^7$	98%
Pat. Si *	51 J.	C	M	21.10.98	$5,1 \times 10^7$	97,5%
Pat. Kr	75 J.	A	M	11.10.99	$4 \times 10^6$	96,9%
Pat. Ja *	71 J. †	C	M	27.05.98	$2,8 \times 10^7$	97%
Pat. La	66 J.	B	M	08.03.00	$1,2 \times 10^7$	97,5%
Kontrolle 1 *				26.05.98	$5,9 \times 10^7$	98%
Kontrolle 2 *				30.09.99	$3,42 \times 10^6$	98,3%
Kontrolle 3 *				30.09.99	$2,64 \times 10^6$	99,9%
Kontrolle 4				06.10.99	$6,96 \times 10^6$	97,8%
Kontrolle 5				06.10.99	$4,56 \times 10^6$	97,7%
Kontrolle 6				24.01.00	$3,55 \times 10^6$	96,1%
Kontrolle 7				24.01.00	$2,5 \times 10^7$	93,4%
Kontrolle 8				24.01.00	$1,4 \times 10^7$	98,6%
Kontrolle 9				24.01.00	$2,66 \times 10^6$	99,1%
Kontrolle 10				24.01.00	$2,28 \times 10^6$	96,6%

Tab. 4.1: Liste der isolierten B-Zellen von CLL-Patienten und Kontrollen (Normalspendern). Es werden Patienteninitialen, Alter, Stadium der Erkrankung nach Binet, Geschlecht, Blutentnahmetag, Zellzahl der isolierten B-Zellen und die Reinheit nach FACscan-Auswertung dargestellt. \* = Die isolierten Zellen dieser Patienten wurden gepoolt und für die exemplarische Darstellung der Etablierung der Genbank eingesetzt (250 ng pro Patient wurden eingesetzt). \*\* = Die isolierten B-Zellen dieser Kontrollen wurden gepoolt und für die exemplarische Darstellung der Etablierung der Genbank eingesetzt (250 ng pro Patient wurden eingesetzt). † = Diese Patienten waren im Jahr 2000 bereits verstorben

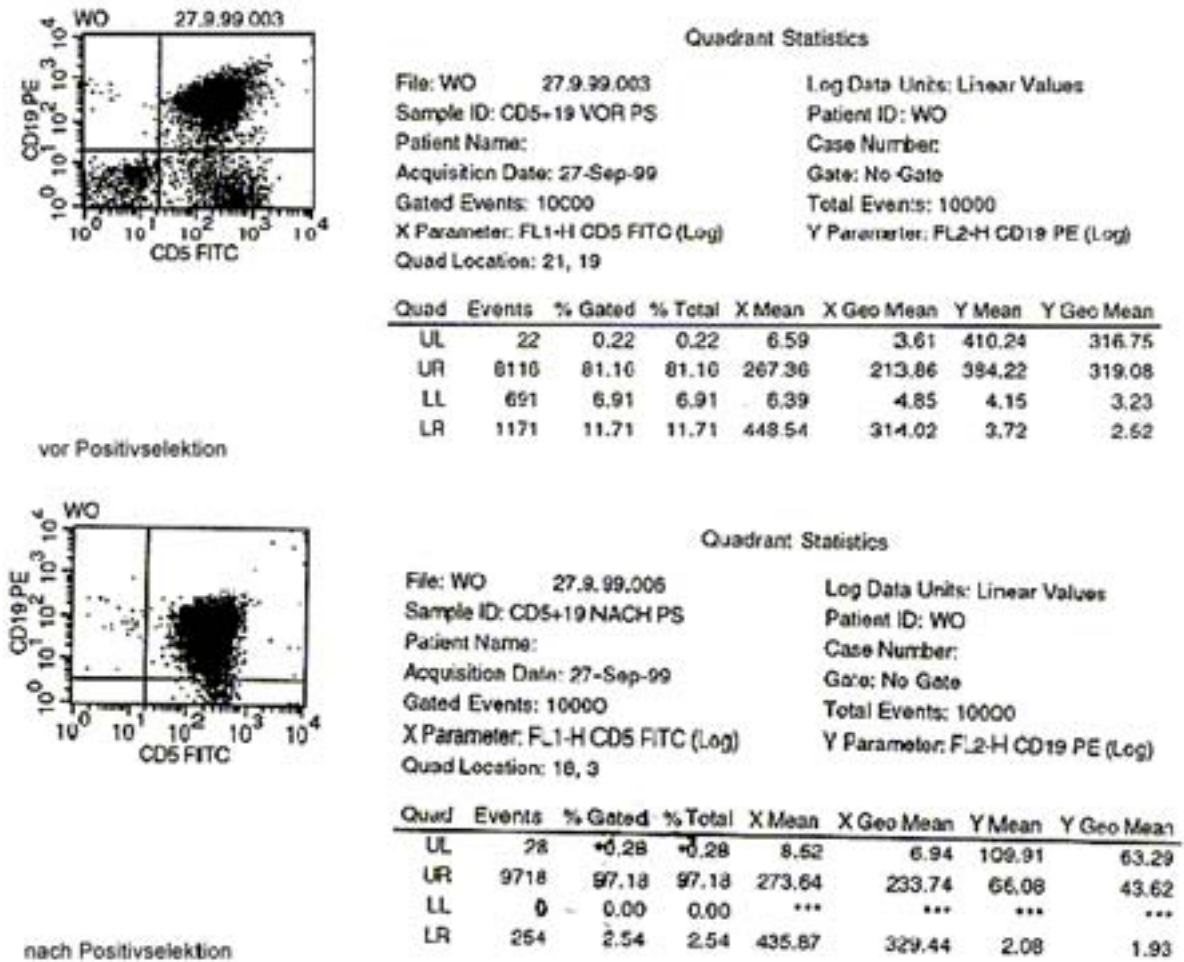


Abb. 4.1: FACscan Auswertung vor und nach Positivselektion (PS) bei Pat. Wö. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD5 und CD19 markiert. Beide Oberflächenmarker sind charakteristisch für B-Zellen. Die Auswertung nach Positivselektion zeigt eine Population, die zu >97% positiv für CD19 und CD5 ist. Sie stellt eine maligne B-Zell Population dar.

#### 4.1.2 Isolierung von Total-RNA

Die Untersuchung der differentiellen Expression auf mRNA-Ebene erforderte die Isolierung von RNA aus den B-Zellen und die Umschreibung zu cDNA. Hierfür wurde der Rneasy-Kit der Firma Qiagen angewendet.

Um die Qualität der gereinigten Gesamt-RNA-Fractionen zu überprüfen, wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die in Abb. 4.2 erkennbaren Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA wiesen daraufhin, daß die RNA intakt und nicht degradiert war.

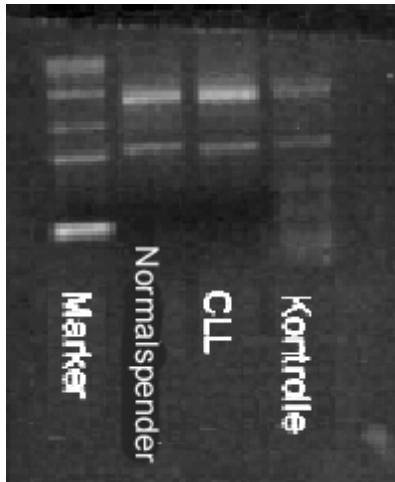


Abb. 4.2: Isolierung von Total-RNA. RNeasy-Mini-Kit, Vergleich von Patienten und gesunden Kontrollgruppen. Die Banden stellen die ribosomale RNA dar. (1,2%-Formaldehyd-Agarose-Gel).

Um im Verlauf der SSH sichere Aussagen über die Differentialität der exprimierten Gene machen zu können, mußte die Konzentration an RNA in den zu vergleichenden Proben gleich sein.

Die Quantität der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt und einheitlich auf 500 ng/µl eingestellt.

#### 4.1.3 Synthese von cDNA mit SMART PCR

Da im Rahmen dieser Doktorarbeit das Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung auf 20 ml Blut je CLL-Patient limitiert war, wurde für die cDNA-Synthese die SMART-Technologie eingesetzt, bei der die RNA zunächst in einzelstängige cDNA umgeschrieben wird, um dann in der anschließenden SMART-PCR vervielfältigt zu werden. Hier kam der SMART PCR cDNA-Synthesis-Kit der Firma Clontech zur Anwendung.

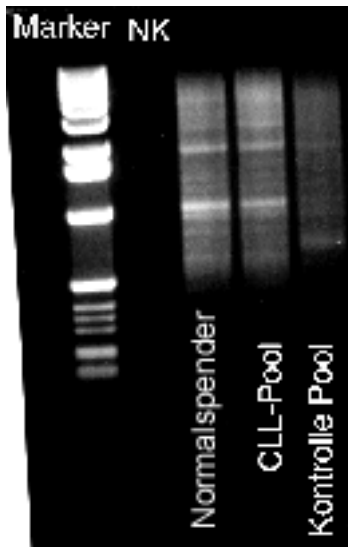


Abb. 4.3: Amplifikation von cDNA (LD PCR)

Nach Auswahl der optimalen Zykluszahl wurde die SMART PCR für die Normalspender-Pool- und die Kontroll-Pool -Proben nach 21 Zyklen und bei der CLL-Pool-Probe nach 20 Zyklen gestoppt. Es wurden jeweils 5µl Probe aufgetragen. Als Kontrolle für die erfolgreiche Durchführung der SMART-PCR-Synthese wurde humane Placenta-Gesamt-RNA mitgeführt. (2% EtBr-Agarose-Gel).

Zunächst wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt und die Zykluszahl bestimmt, bei der die resultierende cDNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung einen Schmier bis maximal 10 000 bp ergab. Da humane mRNA einen Molekulargewicht von etwa 100-10 000 bp aufweist, sollten cDNA's die größer waren als der angegebene Bereich, PCR-Artefakte repräsentieren.

Nach der Bestimmung der optimalen Zykluszahl wurde die SMART-PCR für jede Probe individuell beendet, so daß sowohl der Größenbereich als auch die Konzentration der amplifizierten cDNA's übereinstimmten (Abb. 4.3).

#### 4.1.4 Verdau der cDNA-Proben mit Rsa-I

Nach der cDNA-Synthese folgte der Verdau der Proben mit Rsa-I. Dieser Schritt war notwendig für die anschließende Adaptor-Ligation. Rsa-I schneidet eine spezifische vier Basenpaare lange Sequenz. Die entstandenen Schnittstellen stellen die Bindungsstellen für die Adaptoren dar.

Bei einem erfolgreichen Verdau entstanden Fragmente zwischen 0,1-2 kB. Da die cDNA vor dem Verdau 0,5-10 kB groß war, enthielten die Proben nach dem Verdau kleinere Fragmente.

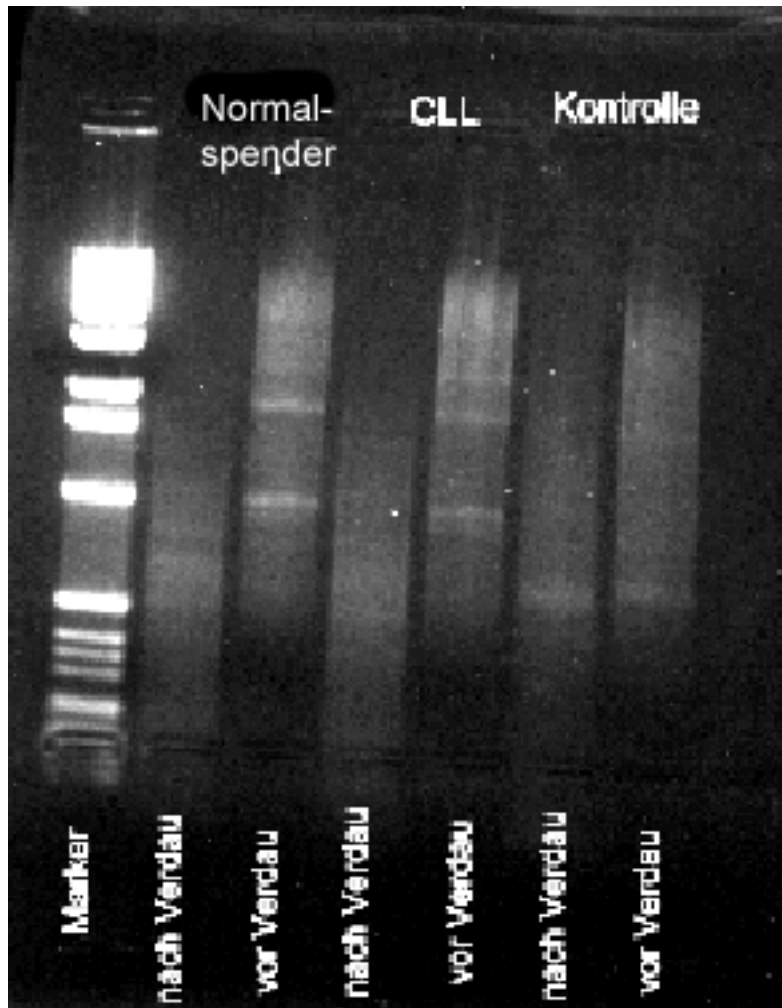


Abb. 4.4: Verdau der cDNA Proben mit Rsa-I. Proben gesunder Proben wurden mit kranken Proben vor und nach Verdau miteinander verglichen. (1,2 %-EtBr-Agarose-Gel)

In Abbildung 4.4 lässt sich erkennen, dass die Proben nach dem Verdau einen Schmier mit kleineren Fragmentgrößen aufwiesen. Die cDNA-Proben vor dem Verdau wiesen im Agarose-Gel größere Fragmente auf. Der deutliche Verkleinerung der cDNAs nach gelelektrophoretischer Auftrennung weist auf eine erfolgreiche Restriktion hin.

#### 4.1.5 Amplifikation der differentiellen Transkripte mittels Suppressiver PCR

Mit Hilfe der 1. und 2. (nested) suppressiven PCR wurden die im Verlauf der SSH angereicherten differentiellen Transkripte exponentiell amplifiziert.

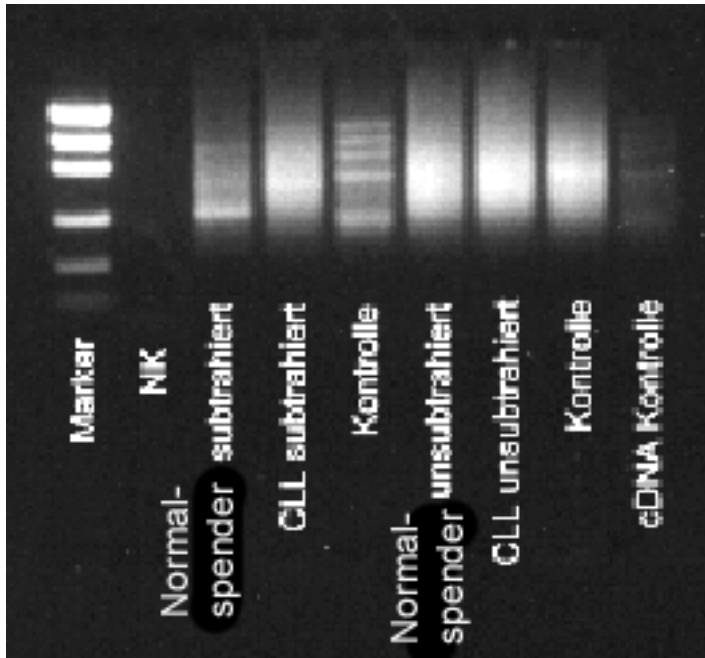


Abb. 4.5: Amplifikation von differentiellen Transkripten mittels suppressiver PCR. Subtrahierte Proben wurden gegen unsubtrahierten Proben aufgetragen. Als Kontrollen wurden eine Negativkontrolle (NK), eine cDNA Kontrolle und jeweils eine subtrahierte und unsubtrahierte Proben mitgeführt. (2%-EtBr-Agarose-Gel).

In Abb. 4.5 wurden subtrahierte Proben gegen unsubtrahierte Proben aufgetragen. Das Bandenmuster in subtrahierten und unsubtrahierten Proben war unterschiedlich. Die unsubtrahierten Proben zeigen einen Schmier, der auf viele verschiedene Fragmente schließen ließ.

Es ist zu erkennen, dass in den subtrahierten Proben stärkere Fragmente gleicher Größe amplifiziert wurden als in den unsubtrahierten Proben. Es konnte dadurch vermutet werden, dass diese Banden die Anreicherung von differentiellen Transkripten darstellten, da sich gleichende Sequenzen subtrahiert wurden und nur die differentiellen Transkripte amplifiziert worden waren.

#### 4.1.6 PCR-Analyse der Subtraktionseffizienz

Gene, die bekanntermaßen etwa gleichstark in den verglichenen Zellen exprimiert werden, können zwischen subtrahierter Probe und unsubtrahierter Kontrolle verglichen werden. Ein gängiges Kontroll-Gen stellt GAPDH dar. GAPDH repräsentiert ein zentrales Enzym des Citratsäurezyklus und wird in normalen wie in malignen B-Zellen abundant exprimiert (Referenz: Ambion, PCR-Kit).

Dieses GAPDH-Transkript ist in vitro bei erfolgreicher Subtraktion in den subtrahierten Proben in geringerer Anzahl enthalten. Mit dieser Methode ließ sich der Erfolg der Subtraktion bestimmen.

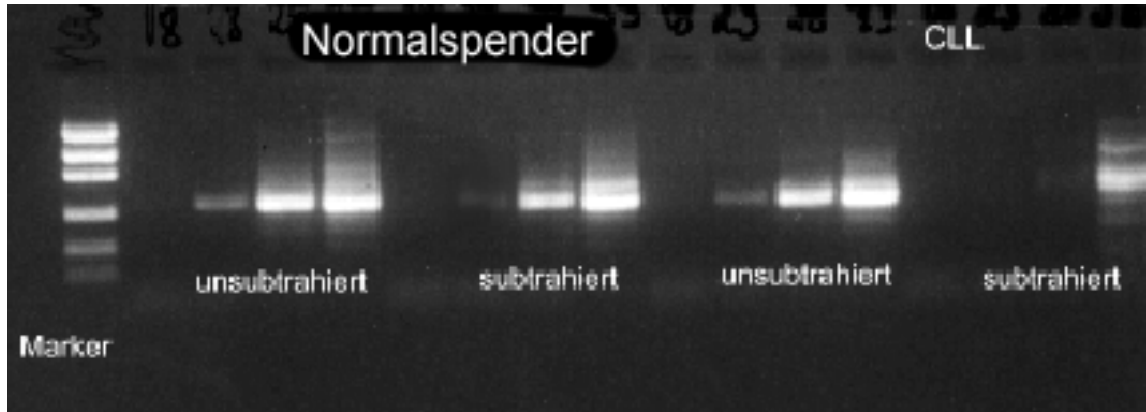


Abb. 4.6: Kontrolle der Subtraktionseffizienz mittels einer PCR. Es wurden unsubtrahierte Proben mit subtrahierten Proben verglichen. Es wurden aus beiden Proben je 20  $\mu$ l nach Zyklus 18, 23, 28, 33 entnommen und aufgetragen (2%-EtBr-Agarose-Gel).

In Abb. 4.6 ist die Intensität der PCR-Produkte in Abhängigkeit der Zyklenzahl bei den subtrahierten cDNA-Proben schwächer als bei den nicht-subtrahierten cDNA-Proben ausgeprägt. Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass in den generierten subtrahierten Normalspender- bzw. CLL-cDNA-Proben differentiell exprimierte Gene angereichert wurden.

#### **4.1.7 Klonierung der subtrahierten cDNA-Populationen in einen pTAdv-Vektor, Transformation von kompetenten E. coli's und Kolonie-PCR**

Nach der Ligation der PCR-Produkte in den pTAdv-Vektor wurden E.coli-Bakterien transformiert und kloniert. Der pTAdv-Vektor enthielt ein LacZ-Gen, das nach Expression das Substrat CSPD umsetzen kann. Dieses Produkt resultierte in einer Blaufärbung. Das jeweilige PCR-Produkt wurde in die Sequenz des LacZ-Gens inseriert, dadurch war bei erfolgreicher Ligation eine Expression dieses Gens und die damit einhergehende Substratumsetzung und Blaufärbung nicht möglich, gebildete E.coli-Kolonien erschienen weiß. Diese weißen Kolonien enthielten Klone, welche durch eine PCR überprüft wurden.

Für die PCR wurde ein M.13-Primerpaar eingesetzt. Diese M.13 Sequenzen flankierten auf dem Vektor das jeweilige ligierte PCR-Produkt.

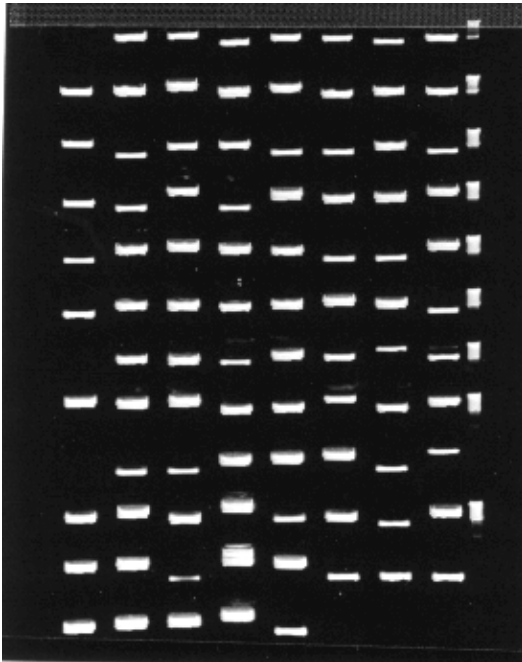


Abb. 4.7: PCR zur Amplifikation und zum Nachweis der erfolgreichen Ligation und Transformation der subtrahierten PCR-Produkte.  
Nachdem die weißen Kolonien gepickt worden waren, wurde für diese Kolonie-PCR ein M.13 Primerpaar eingesetzt und die PCR Produkte nach 35 Zyklen auf ein Gel aufgetragen (2%-EtBr-Agarose-Gel).

Abb. 4.7 zeigt die erfolgreiche Ligation und Transformation, da fast alle gepickten Kolonien Klone enthielten, die als PCR-Produkt in der Kolonie-PCR zu detektieren waren.

#### 4.1.8 Nicht-radioaktiver „Dot-Blot“

Der „Dot-Blot“ stellte die erste Testmethode in der SSH dar. Die differentiellen PCR-Produkte wurden auf eine Membran gepunktet und mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert. Diese Sonde wurde hergestellt, indem bei der Replikation der cDNA Digoxigenin-UTPs eingebaut wurden. Diese Dig-UTPs waren von bestimmten Chemilumineszenz-markierten Antikörpern als Antigen erkennbar. Die Sonde band komplementär an die Kolonie-PCR-Produkte und erzeugte durch den Farbstoff ein Signal.

Da jeweils eine Sonde von CLL-cDNA und eine von cDNA gesunder Kontrollmensen hergestellt wurde, gab die Schwärze des Spots Auskunft über die

Expressionsstärke des jeweiligen Gens in den zu untersuchenden Gruppen. Nach Auswertung der beiden Blots mittels densitometrischer Software konnten diejenigen Klone identifiziert werden, die sich als stark differentiell mit dieser Methode erwiesen.

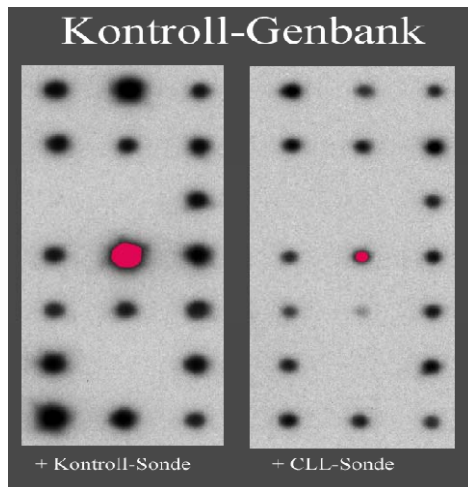


Abb. 4.8 und 4.9: Dot-Blot.

Nylonmembran mit aufgetragenen subtrahierten PCR-Produkten gesunder Kontrollen. Hybridisierung mit CLL-DIG Sonde. Die Eich-Kontrollen stammten aus einer vorher hergestellten Eichreihe (links Normalspender/subtrahiert + Kontroll-DIG; rechts Normalspender/subtrahiert + CLL-DIG).

Die Auswertung der „Dot-Blots“ ergab sowohl differentielle, als auch nicht-differentielle Signale. Exemplarisch wurden die „Dot-Blots“ der subtrahierten Kontroll-Genbank aufgeführt, beim ersten mit subtrahierter Kontroll-cDNA hybridisiert (Abb. 4.8) und beim zweiten mit subtrahierter CLL-cDNA (Abb. 4.9). Vergleicht man die Spots, fällt auf, dass bei unterschiedlicher Sonde auch unterschiedliche Intensitäten der Blots auftraten. Der rot markierte Spot z.B. zeigt bei der Kontroll-Sonde ein stärkeres Signal als mit der CLL-Sonde. Es wurde erkennbar, dass hier ein PCR-Produkt vorlag, welches im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen bei Patienten mit CLL vermindert exprimiert wurde.

#### **4.1.9 Sequenzierung der differentiellen Klone**

Es wurden 69 Proben, die im „Dot-Blot“ differentiell erschienen, gepickt. Diese Proben wurden von Frau Dr. M. Wedde sequenziert und in einem BLAST Programm überprüft. Viele Sequenzen stellten Teile von Immunglobulinen dar oder waren nicht bekannt. Von den 69 Proben erschienen 11 durch ihre Funktion interessant, so dass sie weiter untersucht wurden.

#### **4.1.10 Semiquantitative PCR**

Da eine korrekte Aussage über die reale Differentialität der Gentranskripte nur durch eine quantitative Methode getroffen werden konnte, wurden die im „Dot-Blot“ als differentiell erkannten Sequenzen mit einer semiquantitativen PCR überprüft.

Zyklusabhängig wurden die erste Detektion einer klaren Bande und die Stärken der Banden in den zu vergleichenden Gruppen untersucht.

Das Erscheinen einer Bande bei einer geringen Zykluszahl und die stärkere Expression einer Bande im Vergleich zur anderen Gruppe bestätigte die Anreicherung von differentiellen PCR-Produkten. Der Vergleich der Banden zwischen CLL-Patienten und Kontrollgruppe führte zu quantitative Unterschieden in der Expression der untersuchten Transkripte.

Die PCR für jedes zu untersuchende Gen wurde mit 9 an CLL erkrankten Patienten und 5 gesunden Kontrollen durchgeführt. Nach Zyklus 21, 24, 27, 30 und 33 wurden jeweils gleiche Probenmengen entnommen, und mittels einer Gelelektrophorese ausgewertet.

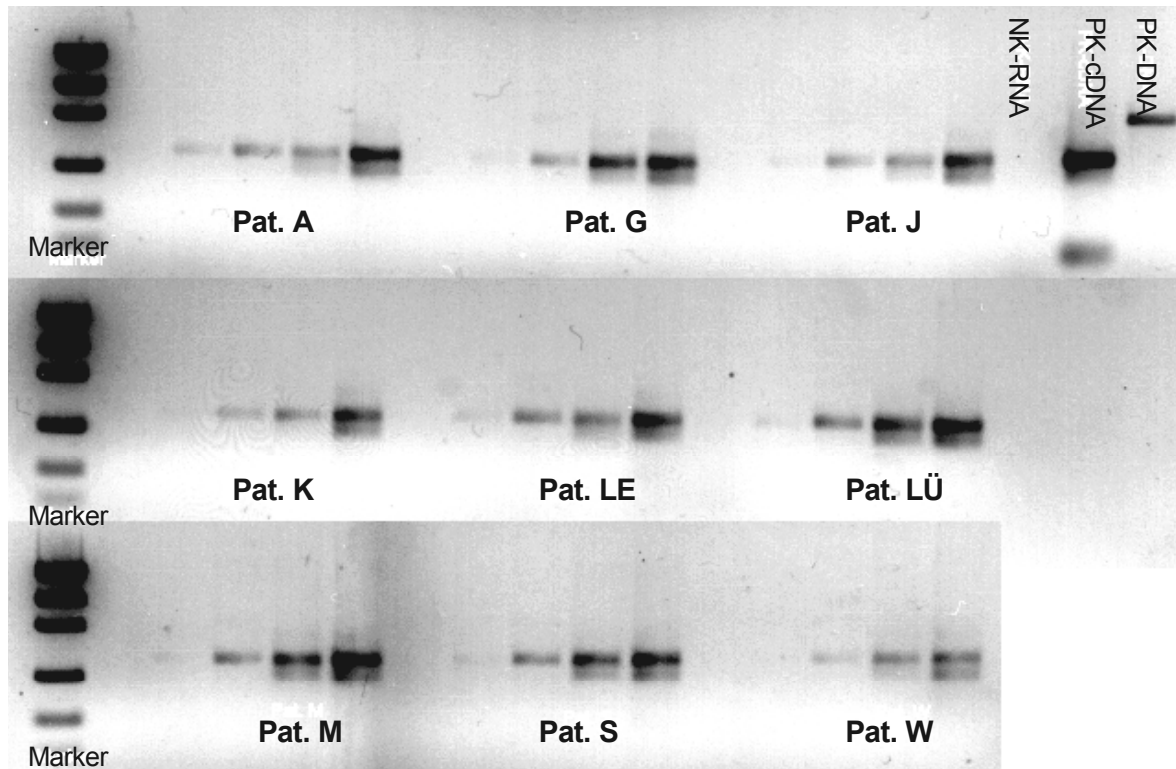


Abb. 4.10: Semiquantitative PCR mit einem für die zu untersuchende Sequenz hergestellten Primerpaar (interne Nummer: 1438).

Es sind CLL-Patienten (n=9) aufgeführt. Es wurden gleiche Mengen an Probe bei Zyklus 21, 24, 27, 30 und 33 abgenommen und auf das Gel aufgetragen (2%-EtBr-Agarose-Gel).

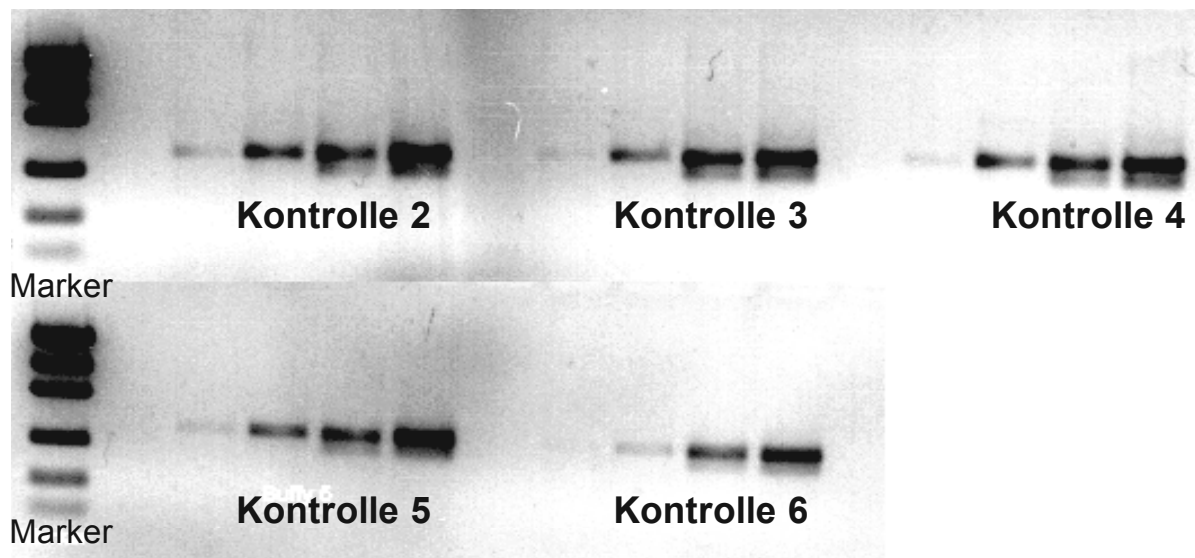


Abb. 4.11: Semiquantitative PCR mit einem für die zu untersuchende Sequenz hergestellten Primerpaar. (interne Nummer 1438).

Es sind 5 gesunde Kontrollen (Buffy coats) aufgeführt. Es wurden gleiche Mengen an Probe bei Zyklus 21, 24, 27, 30 und 33 abgenommen und auf das Gel aufgetragen (2%-EtBr-Agarose-Gel).

In Abbildung 4.10 sind zyklusabhängige Amplifikationen für eine bestimmte Sequenz dargestellt, in Abbildung 4.11 die der gesunden Kontrollgruppe. Sind bei niedrigen

Zykluszahlen schon Banden erkennbar und sind die Banden stark ausgeprägt, ist das ein Zeichen für eine hohe Expression des Genes in diesem Kollektiv.

In der erfolgten PCR waren die Banden der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt.

Von den 9 untersuchten Sequenzen waren zwei differentiell.

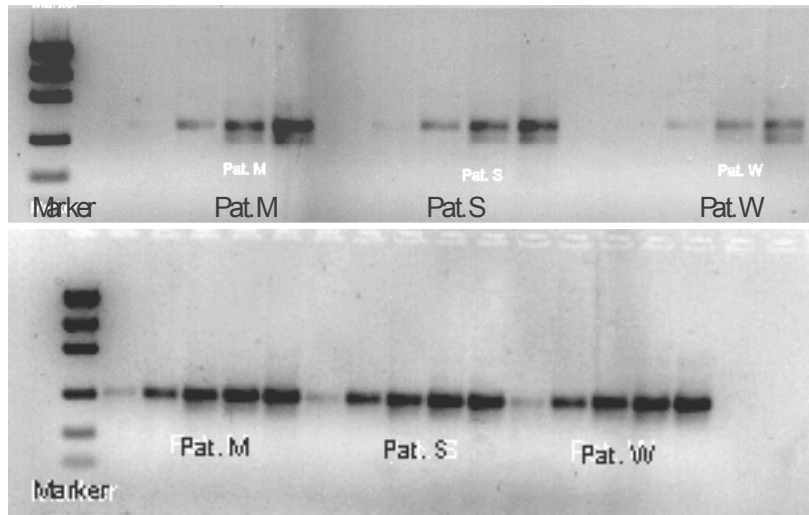


Abb. 4.12: Semiquantitative PCR mit einem für die zu untersuchende Sequenz hergestellten Primerpaar (interne Nummer 1438).

Das untere Bild zeigt die den drei aufgeführten Patienten entsprechende Aktin-PCR. Es wurden gleiche Mengen an Probe bei Zyklus 21, 24, 27, 30 und 33 abgenommen und auf das Gel aufgetragen. (2%-EtBr-Agarose-Gel).

In Abb. 4.12 wurde die RT-PCR mit dem bei Abbildung 3.8 aufgeführten Primer Paar und der entsprechenden Aktin-PCR verglichen. Aktin wurde als Referenzgen zum Abgleichen der Ergebnisse herangezogen, da es bekanntermaßen etwa gleichstark in den verglichenen Zellen exprimiert wird. In dieser Abbildung wurden beispielhaft für drei Patienten das Gel der Aktin-PCR aufgeführt.

Die Aktin-Banden der einzelnen Patienten waren untereinander in gleicher Stärke zu erkennen.

## 4.2 Auswertung einer differentiellen Genbank

Die Expression von 11 Genen wurde mittels semiquantitativer PCR untersucht und zusätzlich der Oberflächenmarker CD5 als Marker mitgeführt. Folgende Tabelle führt die Ergebnisse der BLAST-Suche und die Auswertungen der semiquantitativen PCR auf. Bei den Vergleichen zwischen Normal Spendern und CLL-Patienten bedeutet ein p-Wert von  $<0,05$  einen signifikanten Unterschied, das zu untersuchende Gen gilt somit als differentiell.

Tabelle 4.2 (S. 57 - S. 59):

Aufgeführt wurden die Genbanken J/S (Patient J./subtrahiert) und Kontrolle/S (Kontrollgruppe/subtrahiert). Die Werte der Genbank J/S entstammten der suppressiven subtrahierten Hybridisierung eines Patienten im Binet Stadium C mit dem Blut gesunder Kontrollmensch (Normal-Spenderblut). Dieses Spenderblut diente als Ausgangsmaterial für die Erstellung der Genbank Kontrolle/S mit der Methode der SSH. In diesem Fall wurde das gesunde Spenderblut von dem Material des Patienten J. subtrahiert.

„Dot-Blot“-Unterschied der Hybridisierungs-Signale:

+ = schwach    ++ = mittel    +++ = stark

Die subtrahierte Richtung beim Screening der Werte mittels „Dot-Blot“ stimmte mit der RT-PCR überein.

Patient J. - Kontrolle = Kontroll-Material wurde in der SSH vom Patient J. subtrahiert.

Kontrolle vs. Binet = siehe Auswertung, Seite 41, Fläche x Dichte (Area x Mean) Werte der Banden wurden ausgewertet und nach einem signifikanten Unterschied untersucht (p-Wert).

Ergebnisse der Genbanken Pat. J/S und Kontrolle/S											
Klon-Nr.	aufgefundene Signale: (Blast Hit Found) Nr. / Signale(n)	Identität + Strang	Länge des seq. Einsatzes (insert)	Einge- setzte Seq. für Primer- Suche	Anzahl der homo- logen Sequenz	Unterschied im „Dot-Blot“	Semi. PCR: Kontrolle2 vs. Pat. J	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet AB (p-Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet C (p- Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs CLL (p- Wert)	Locus
	<b>Genbank : Pat. J/S PatientJ.- Kontrolle</b>										
	<b>CD5</b>						6,51	7,99	9,08 (0,053)	8,36 (0,016)	1q21- q23
	<b>CD20</b>									(0,02)	
1416	(n): 7 Hits H.sapiens BCL2/adenovirus E1B 19 kD – inter- acting protein 2 (BNIP2) mRNA	164/185 (88%)  + / +	537	2382 bp	1	+	1,19				
1421	(n): 508 Hits Human farnesyl pyrophosphate synthetase mRNA (hpt807), 3' end	90/90 (100%)  + / -	132	1098 bp	3	+	0,64	0,99	0,96 (>0,9)	0,98 (0,8)	15
1427	(n): 3 Hits Homo sapiens upregulated by 1,25 dihydroxyvitamin	341/351 (96%)	414	2704 bp	1	++	1,52	0,94	1,42 (0,02)	1,112 (0,24)	

Ergebnisse der Genbanken Pat. J/S und Kontrolle/S											
Klon-Nr.	aufgefundene Signale: (Blast Hit Found) Nr. / Signale(n)	Identität + Strang	Länge des seq. Einsatzes (insert)	Eingesetzte Seq. für Primer-Suche	Anzahl der homologen Sequenz	Unterschied im „Dot-Blot“	Semi. PCR: Kontrolle2 vs. Pat. J	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet AB (p-Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet C (p- Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs CLL (p- Wert)	Locus
	D-3 (VDUP1) mRNA	+ / +									
1428	(n): 11 Hits Homo sapiens ribosomal protein L18a mRNA, complete cds.	86/96 (89%)  + / -	186	602 bp	1	++	0,78	0,94	0,94 (0,46)	0,94 (0,56)	

	<b>Genbank: Kontrolle/S Kontrolle- Patient J.</b>										
1433	(n): 47 Hits Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 (gamma, 52 kD) (EIF2S3) mRNA	298/301 (99%)  + / +	336	1440 bp	1	++	1,8	1,39 (0,27)	1,21 (0,46)	1,32 (0,26)	1,2,12 Xp22.2- p22.1
1438	(n): 8 Hits Homo sapiens MAD-3 mRNA	202/253 (79%)	276	1550 bp	1	++	3,84	2,24	1,77	2,06 (0,009)	14q13

Ergebnisse der Genbanken Pat. J/S und Kontrolle/S											
Klon-Nr.	aufgefundene Signale: (Blast Hit Found) Nr. / Signale(n)	Identität + Strang	Länge des seq. Einsatzes (insert)	Einge- setzte Seq. für Primer- Suche	Anzahl der homo- logen Sequenz	Unterschied im „Dot-Blot“	Semi. PCR: Kontrolle2 vs. Pat. J	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet AB (p-Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet C (p- Wert)	Semi. PCR: Kontrolle vs CLL (p- Wert)	Locus
	encoding IκB-like activity, complete cds.	+ / -									
1441	(n): 23 Hits Human sapiens ribosomal protein S13 (RPS13) mRNA	172/183 (93%)  + / -	259	530 bp	1	++	0,92	1,29	0,86 (0,65)	1,11 (0,74)	11p
1454	(n): 27 Hits Human heart mRNA for heat shock protein 90, partial cds.	172/183 (93%)  + / +	325	1911 bp	1	+	1,82	0,74	0,81 (0,46)	0,76 (0,84)	
1466	(n): 14 Hits Homo sapiens mRNA for leucocyte adhesion receptor, L-selectin	211/219 (96%)  + / +	248	1569 bp	4	++	1,05	0,91	0,93 (0,46)	0,92 (0,64)	1q23-q25
1469	(n): 14 Hits Human placenta (Diff48) mRNA, complete cds.	343/353 (97%)  + / -	377	2285 bp	2	++	2,06	0,79 (0,14)	1,13 (0,88)	0,88 (0,32)	6
1470	(n): 10 Hits	359/390	534	2087	3	+	0,84				

<b>Ergebnisse der Genbanken Pat. J/S und Kontrolle/S</b>											
<b>Klon-Nr.</b>	<b>aufgefundene Signale: (Blast Hit Found) Nr. / Signale(n)</b>	<b>Identität + Strang</b>	<b>Länge des seq. Einsatzes (insert)</b>	<b>Einge- setzte Seq. für Primer- Suche</b>	<b>Anzahl der homo- logen Sequenz</b>	<b>Unterschied im „Dot-Blot“</b>	<b>Semi. PCR: Kontrolle2 vs. Pat. J</b>	<b>Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet AB (p-Wert)</b>	<b>Semi. PCR: Kontrolle vs. Binet C (p- Wert)</b>	<b>Semi. PCR: Kontrolle vs CLL (p- Wert)</b>	<b>Locus</b>
	Homo sapiens metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein, secreted from mRNA, complete cds.	(92%)  + / -		bp							

### 4.2.1 Auswertung von CD5

Im folgenden wird auf die Gene eingegangen, die einen signifikanten Unterschied zwischen CLL-Patienten und der Kontrollgruppe (Normalspender) aufwiesen. Das Gen CD5 wurde als Überprüfung der Genbank mitgeführt; es gilt als phänotypisches Charakteristikum von B-CLL Zellen und sollte bei CLL-Patienten stärker exprimiert werden als bei Normalspendern.

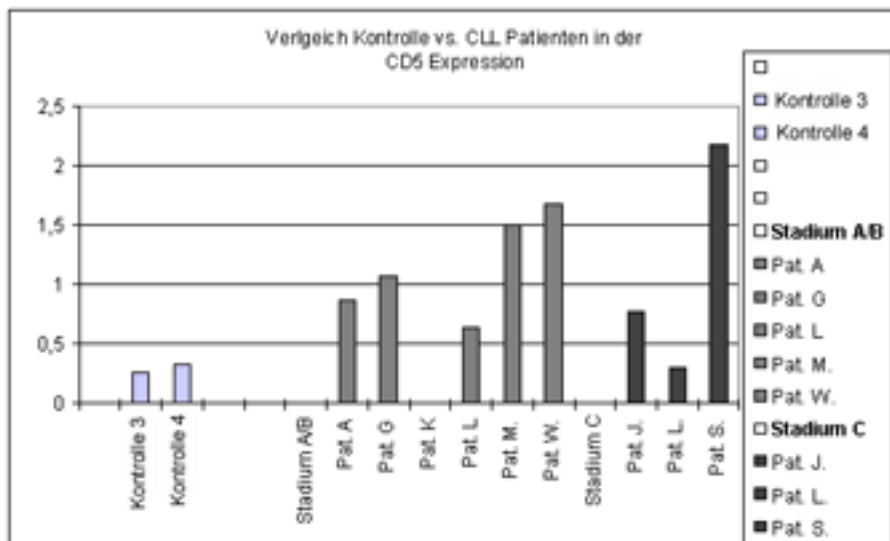


Abb. 4.13: CD5 Expression im Vergleich Kontrolle vs. CLL

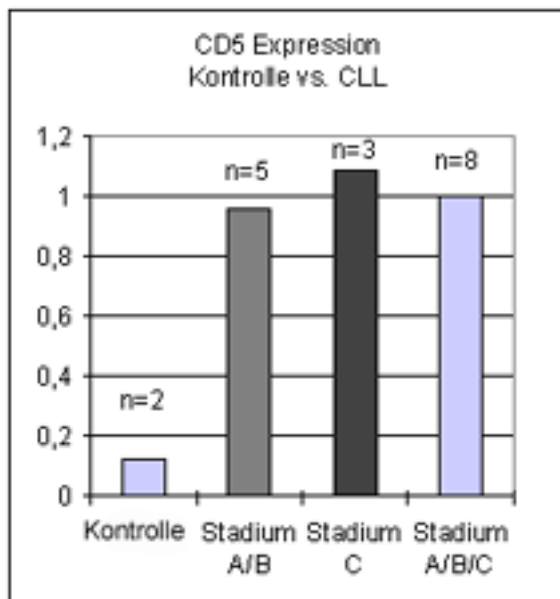


Abb. 4.14: CD5 Expression im Vergleich Kontrolle vs. CLL-Binet Stadien

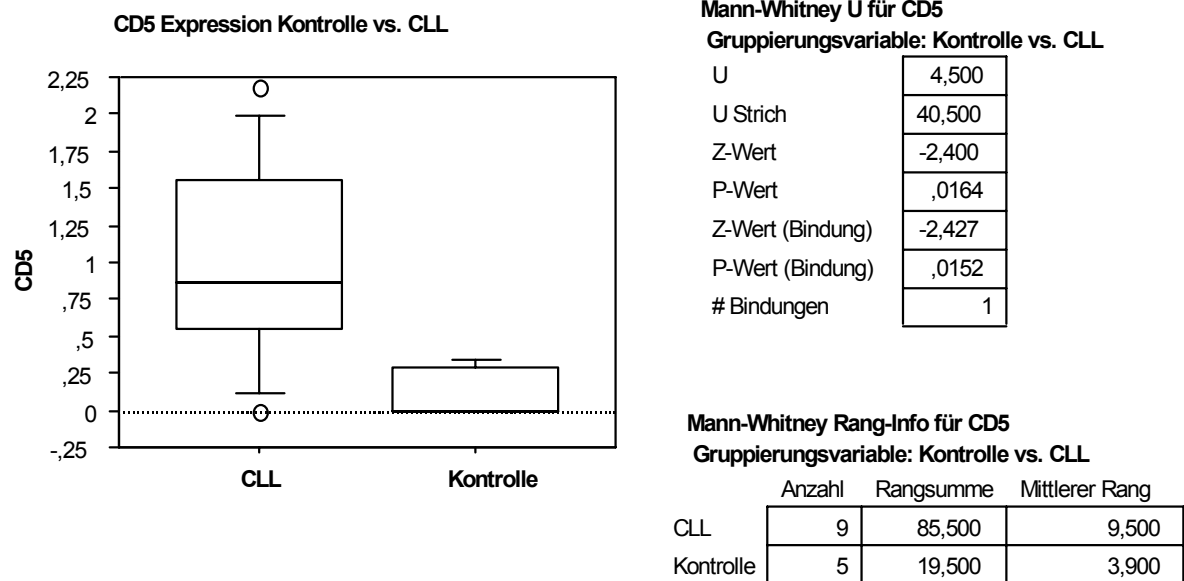


Abb. 4.15: Box-Diagramm, Mann-Whitney Test CD5 Expression Kontrolle vs. CLL

In obenstehender Tabelle wurde die Expression von CD5 bei Normal Spendern mit denen der CLL Patienten in verschiedenen Binet-Stadien aufgeführt. Mit den Werten der semiquantitativen PCR wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt, der die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für die Differentialität des Genes lieferte. Der p-Wert betrug 0,015. Daraus ließ sich folgern, dass CD5-cDNA in B-CLL-Zellen signifikant stärker exprimiert wurde..

#### 4.2.2 Auswertung von CD20

CD20 ist ein funktionell wichtiges Oberflächenmolekül auf B-Zellen. In einem Therapieansatz gegen die B-CLL mit Rituximab werden Antikörper gegen CD20 eingesetzt. Dabei wird die Apoptose der Zellen induziert.

In den folgenden Abbildungen wurde die Expression von cDNA für CD20 bei Normal Spendern und CLL-Patienten aufgeführt.

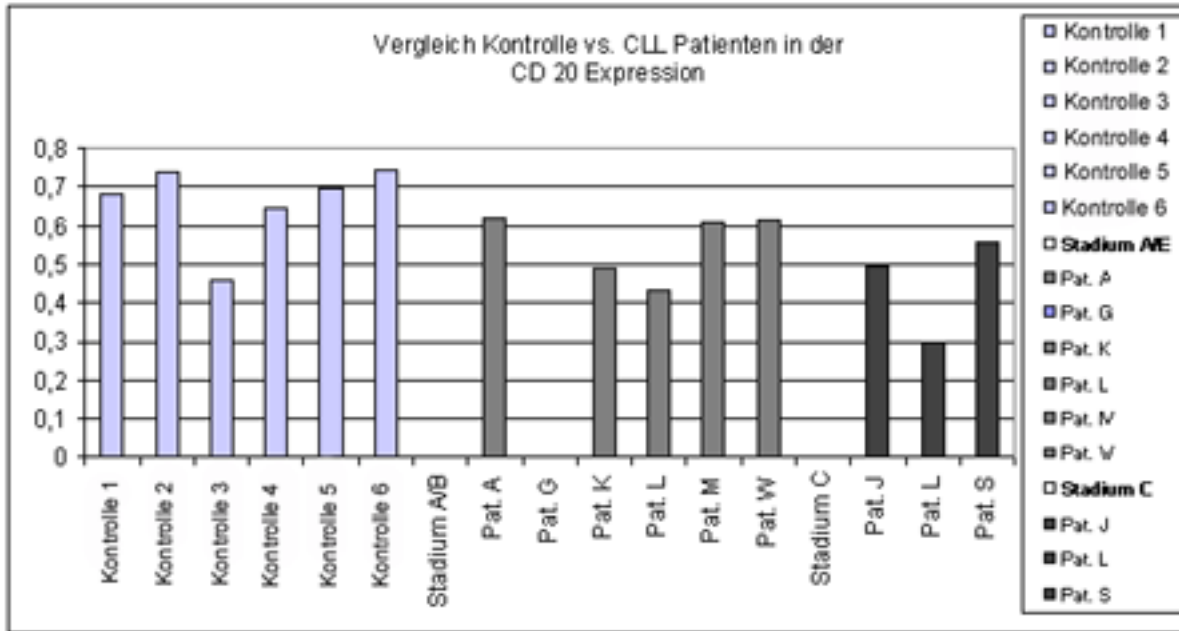


Abb. 4.16: CD20 Expression Kontrolle vs. CLL-Patienten. Pat. G wurde wegen fehlender Werte nicht dargestellt.

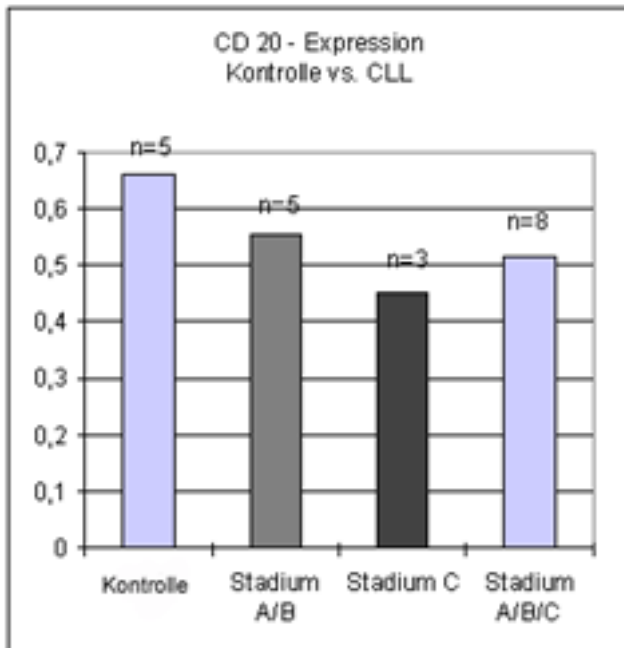


Abb. 4.17: CD20 Expression im Vergleich Kontrolle vs. CLL-Patienten in den verschiedenen Binet-Stadien.

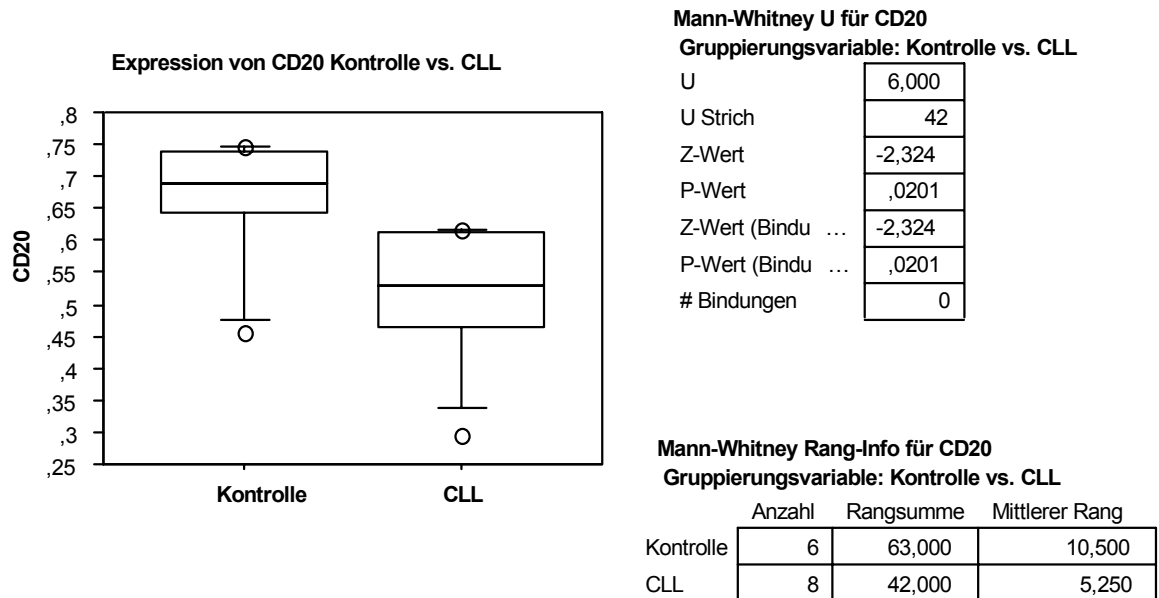


Abb. 4.18: Mann-Whitney Test der CD20 Expression Kontrolle vs. CLL-Patienten, Box-Diagramm.

Der p-Wert der Expression von CD20 bei Normal Spendern vs. CLL-Patienten betrug 0,02. Nach diesem Ergebnis wurde CD20 in CLL-Patienten signifikant schwächer exprimiert als in der gesunden Kontrollgruppe.

#### 4.2.3 Auswertung des I $\kappa$ B/Mad-3 Gens (interne Probennummer 1438)

Im folgenden wird näher auf die Expression der cDNA für I $\kappa$ B $\alpha$  (Mad-3) eingegangen. Die Expression der umgeschriebenen Transkripte war in der BLAST-Suche zu 80% homolog mit dem genannten Gen.

Es wurden wiederum die Expression in der Kontrollgruppe mit der in CLL-Patienten verglichen, in der ersten Tabelle (Abb. 4.19) individuell, in der zweiten (Abb. 4.20) nach Binet-Stadium unterteilt, und in der dritten Abbildung (Abb. 4.21) als Mann-Whitney Test mit Box-Diagramm. Die in Abb. 4.19 und 4.20 angegebenen Fallzahlen weichen in dieser Auswertung ab, da die RT-PCR wiederholt wurde, und im folgenden die Ergebnisse von zwei weiteren Patienten und 5 weiteren Normal Spendern mit aufgelistet wurden.

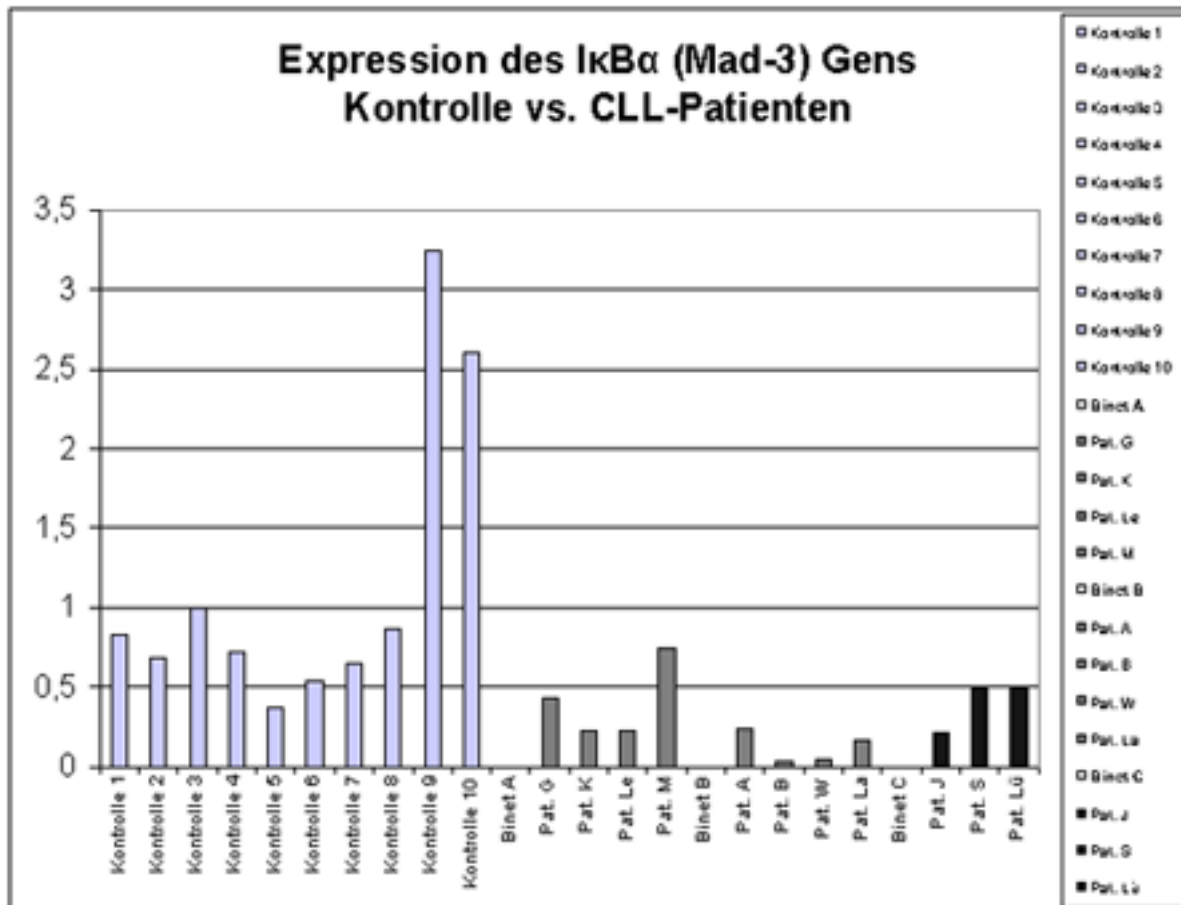


Abb. 4.19: IκBα Expression Kontrollen vs. CLL-Patienten

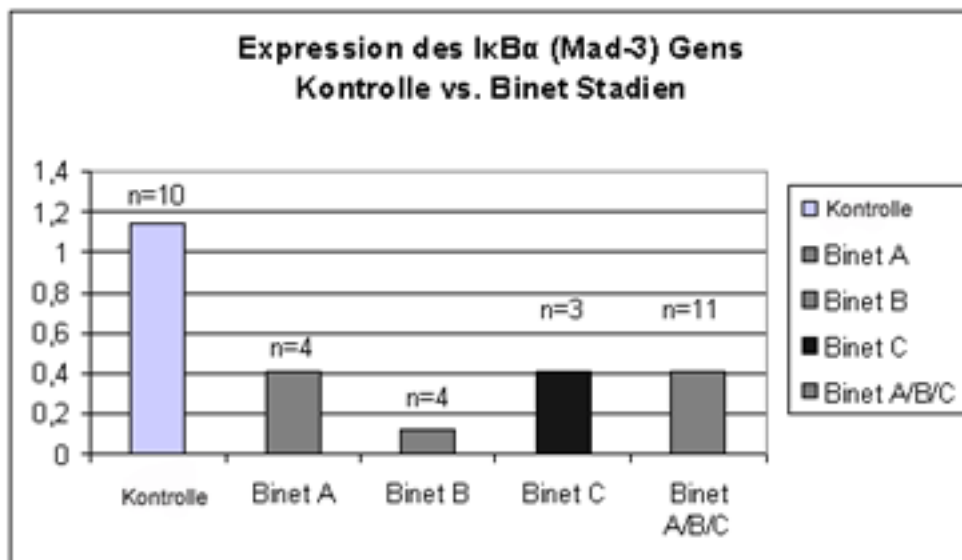


Abb. 4.20: Expression des IκBα (Mad-3) Gens im Vergleich Kontrolle vs. CLL-Binet Stadien

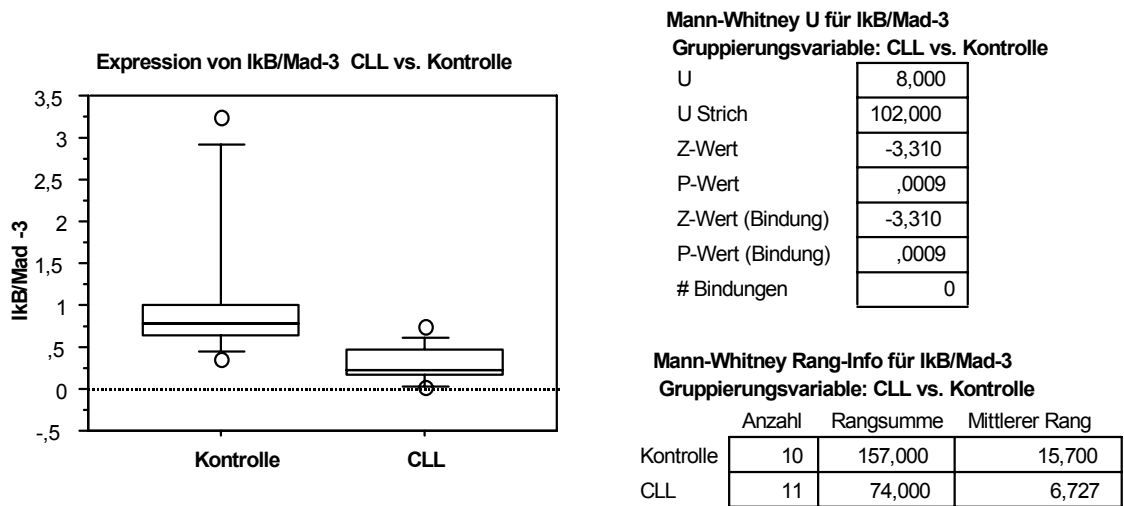


Abb. 4.21: Mann-Whitney Test für die Expression des Mad-3 Gens Kontrolle vs. CLL, Box Diagramm.

Der p-Wert betrug 0,009. Das Mad-3 Gen war in der Kontrollgruppe stärker exprimiert als in CLL-Zellen.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von 11 untersuchten Genen waren drei Gene differentiell, CD5, CD20 und das IκB/Mad-3 Gen. CD 5 wurde nicht aus den Kolonie-PCRs gepickt, sondern als Überprüfung mitgeführt. Die als differentiell nachgewiesenen Gene waren CD20 und IκB/Mad-3.

Andere Gene, wie z.B. das VDUP1-Gen (interne Nummer 1427) zeigten differentielle Tendenzen, vor allem bei dem Vergleich der Expression zwischen Kontrollgruppe und CLL-Binet-C Patienten. Bei dieser Auswertung betrug der p-Wert 0,02.

In folgender Tabelle sind alle p-Werte für die untersuchten Gene aufgeführt.

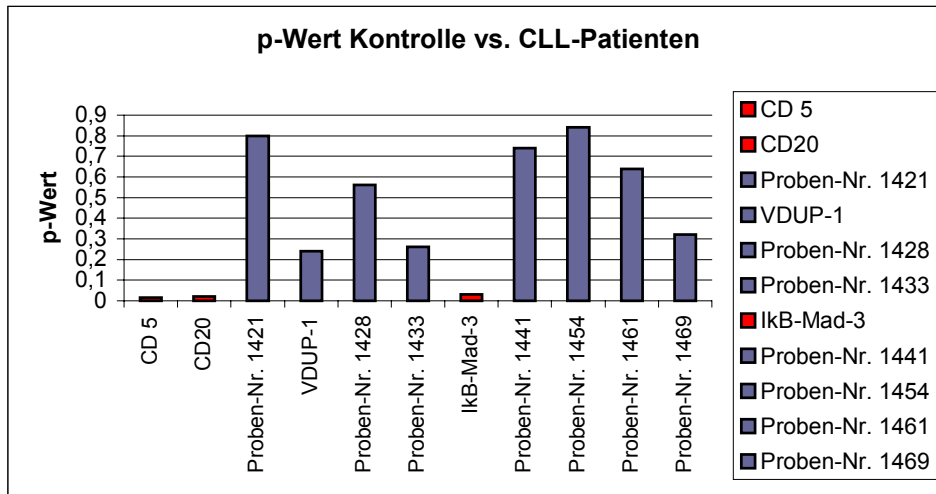


Abb. 4.22: p-Werte Kontrolle vs. CLL

(p-Wert <0,05 = Differentialität des Gens; signifikanter Unterschied in der Expression zw. Kontrollgruppe und Patienten).

Die in Abb. 4.22 farblich markierten Gene wurden in dieser Arbeit differentiell nachgewiesen. Auf den folgenden Seiten werden mögliche Funktionen dieser Gene in der Pathophysiologie der B-CLL diskutiert.

## 5 Diskussion

Die chronische lymphathische Leukämie ist eine Erkrankung, deren Entstehungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt werden konnten. Die heutigen Therapieansätze bieten weiterhin keine dauerhafte Heilung. Eine Zunahme der CLL ist durch eine verlängerte Lebenserwartung der Bevölkerung anzunehmen. Ziel dieser Arbeit war es, von B-CLL-Zellen differentiell exprimierte Gene zu entdecken, die Hilfe bei der Entschlüsselung der Ursachen der B-CLL liefern könnten. Dafür wurden bei CLL-Erkrankten und Gesunden auf mRNA-Ebene differentielle Transkripte in Form von cDNAs untersucht.

Phänotypische Unterschiede zwischen Zellen eines Organismus werden durch die differentielle Expression ihrer identischen Gene definiert. Für die Identifizierung und den Vergleich der Gentranskripte, die für diese phänotypischen Veränderungen verantwortlich sind, werden geeignete Methoden benötigt. Eine mögliche Methode stellt die subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) dar [11].

Die SSH-Methode ist eine effiziente Technik, um cDNAs zu generieren, welche in hohem Maße differentielle Gentranskripte enthalten [12].

Die SSH wurde mit der Isolierung von Total-RNA begonnen; es war wichtig, dass die Menge an isolierter RNA in den zu vergleichenden Proben gleich konzentriert war, um nicht falsch-positive Ergebnisse zu erhalten (Ergebnisse, 4.1.2, S. 45).

Generell stellt die Isolierung seltener Transkripte ein großes Problem in der cDNA-Subtraktion dar. G. Gurskaya et al. beschrieb 1995, dass gerade die Produkte schwach exprimierter Gene eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen spielen können und schlug als Lösung die Angleichung der spezifischen cDNAs in der Tester-Fraktion während der Subtraktion vor [13]. Als Tester wird die cDNA bezeichnet, die differentielle Gene enthält. Nach Gurskaya ist es entscheidend, dass die Angleichung während der Subtraktion stattfindet, denn eine vorherige Angleichung hätte einen Verlust an Differentialität zur Folge und viele differentiell exprimierte Gene blieben unentdeckt. Eine Angleichung nach der Subtraktion würde die Anreicherung sehr schwacher Transkripte begünstigen und das Ergebnis der Methode verfälschen [13].

In der PCR-Kontrolle der Subtraktionseffizienz (Ergebnisse, 4.1.6, S. 49) wurden subtrahierte und unsubtrahierte Proben miteinander hinsichtlich ihrer Expression des GAPDH-Gens verglichen. Dieses Gen ist in beiden Populationen aktiv und wird

daher stark subtrahiert. Die Konzentration war in der subtrahierten Probe viel schwächer und beweist damit eine erfolgreiche Subtraktion.

Als Suchmethode für differentielle Gentranskripte wurde der „Dot-Blot“ und die semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Im „Dot-Blot“ als differentiell erkannte Gentranskripte wurden im Anschluss mittels semiquantitativer PCR auf ihre reale Differentialität überprüft.

Die subtraktive Hybridisierung ist eine weit verbreitete Methode, um differentielle Gentranskripte nachzuweisen. Der technische und zeitliche Aufwand ist zwar größer als zum Beispiel bei der Methode des „differential display“, bei der Fraktionen von Total-RNA zweier Populationen amplifiziert werden und dann im Gel auf Differentialität analysiert werden. C.G. Vedoy et al. zeigte 1999 die großen Probleme in dieser Methode aufgrund der Generierung falsch positiver Ergebnisse, fehlender Nachweise von selten exprimierten Genen und des Einsatzes von großen Mengen an RNA [14]. Daher hat sich die SSH als Nachweisverfahren durchgesetzt.

Für bestimmte Anwendungen wird in Zukunft der „DNA-Mikroarray“ an Bedeutung gewinnen. Auf diesen Chips befinden sich DNA-Sequenzen, die mit den zu untersuchenden cDNA hybridisiert werden, welche vorher mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden sind. Mittels entsprechender Software lassen sich dann die erhaltenen Bilder auswerten. Diese Methode bietet die Möglichkeit einer schnellen und einfachen Überprüfung von differentiell exprimierten Genen. Die subtraktive Hybridisierung wird weiterhin aktuell bleiben, da für die Technik des „DNA-Mikroarray“ differentielle cDNAs benötigt werden, die mittels der SSH generiert werden können.

Auch nach der Entschlüsselung des Genoms gibt es weiterhin viele Sequenzen mit ungeklärter Funktion. Zum Zeitpunkt der Auswertung der erstellten Genbanken in dieser Arbeit waren ca. 80% der Sequenzen unbekannt. Die SSH stellt auch in Zukunft durch die Generierung differentieller Transkripte eine effiziente Methode dar, Sequenzen mit ungeklärten Funktionen zu finden und durch weitere Untersuchungen, Funktionsprüfungen und Modellentwicklungen interessante Ergebnisse in der Erforschung des Genoms zu liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SSH bei der Suche nach differentiellen Gentranskripten in der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) eingesetzt. Zhang et al. untersuchten mit Hilfe der SSH differentielle Genexpressionen in

Lungentumoren [15], Porkka et al. detektieren Gentranskripte bei malignen Prostatazellen [16] und Jin et al. widmeten sich der Suche nach unterschiedlicher Genexpression in verschiedenen Gewebearten [17].

In der vorliegenden Arbeit war die Ausbeute an differentiellen Genen in den erstellten Genbanken gering. Es wurden 69 Proben, die im „Dot-Blot“ differentiell erschienen, aus der Kolonie-PCR, die knapp 400 Proben enthielt, sequenziert. Von den 69 Proben hatten 11 Proben eine bekannte Sequenz und waren zur weiteren Untersuchung interessant.

(siehe 4.2, S. 57-S. 60)

In der semiquantitativen PCR wurden die mRNA-Mengen der im „Dot-Blot“ differentiell getesteten Proben in den zu untersuchenden Populationen verglichen. Es bestätigten sich drei Gene als differentiell, wobei ein Gentranskript nicht aus der Subtraktion gewonnen wurde, sondern als Kontrolle mitgeführt worden war. Dieses war das Gen für den Oberflächenmarker CD5, der bei CLL-Patienten stärker exprimiert wurde. Maligne B-Zellen entwickeln sich aus CD5 positiven Subpopulationen, CD5 gilt als Marker für die Diagnostik der B-CLL. Damit bestätigte sich die Qualität der Genbank [3].

Das erste Gen, welches in dieser Doktorarbeit als differentiell exprimiert identifiziert wurde, war CD20, ebenfalls ein Oberflächenmarker der B-CLL.

CD20 scheint in der Pathophysiologie der B-Zellen ein bedeutender Faktor zu sein; T. Pickartz et al. stellten fest, CD20-negative B-CLL-Zellen in vitro CD20 re-exprimieren können [10].

Daher stellt CD20 einen interessanten Angriffspunkt in der Behandlung der B-CLL dar. U. Winkler beschrieb 1999 die Wirkungsweise des Anti-CD20 Antikörper Rituximab (IDEC-C2B8). Es wurde vermutet, dass Rituximab an CD20 bindet und über einen vermehrten Einstrom von Calcium in die B-Zelle Apoptose auslösen kann, da CD20 ein Calcium-Kanal zu sein scheint [18]. Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein ubiquitär vorkommendes biologisches Prinzip.

Beim apoptotischen Zelltod tritt zuerst eine Instabilität der Membran auf, ein sogenanntes Membranblebbing. Weiterhin wird die DNA durch Endonukleasen in Fragmente spezifischer Größe (180 bp bzw. vielfache davon) zerteilt. Im Gegensatz

zur Nekrose werden keine Entzündungsmediatoren aktiviert, Fragmente werden durch apoptotische Vesikel abgeschnürt und schließlich von Zellen des retikulo-histiozytären Systems phagozytiert.

Um die Funktion eines Calcium-Kanals ausüben zu können, scheint CD20 nach M. Polyak et al. eine Neuverteilung innerhalb unlöslicher membraner Mikroregionen innerhalb der Zelle zu durchwandern [19]. Die mögliche Inhibierung dieser Neuverteilung, aufgezeigt in Abb. 5.1 die Topologie von CD20, scheint in der Zukunft genauere Vorstellung von der Funktionsweise von CD20 zu erbringen.

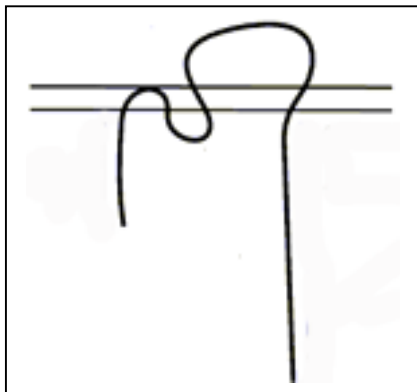


Abb. 5.1: CD20 Topologie.

Das Oberflächenprotein scheint nicht-glykolisiert zu sein und vier transmembrane Regionen zu besitzen. Intrazellulär befinden sich Amino- und Carboxylendungen. Drei topologische Orientierungen scheinen möglich zu sein. Verdauung mit Protease unterstützten die gezeigte Darstellung.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (siehe 4.2.2, S. 62) wurde CD20 in CLL-Patienten signifikant schwächer exprimiert als in gesunden Kontrollpersonen. Dies deckte sich mit der Tatsache, dass durchflusszytometrisch ebenfalls CD20 weniger stark auf B-CLL-Zellen nachgewiesen wurde als auf normalen B-Zellen [10]. Dieses Ergebnis könnte für die klinische Effektivität des anti-CD20-Antikörpers Rituximab von Bedeutung sein. U. Winkler et al. diskutierte, dass die relative Expression nicht mit der Effektivität der Rituximab-Wirkung zusammenhängt. Es wurde angenommen, dass nur eine minimale Expression von CD20 vorhanden sein muss, um eine effektive Wirkung des CD20 Antikörpers hervorzurufen [18].

Auch T.Pickartz et al. stellten eine bei CLL-Erkrankten um die Hälfte geringere Expression von CD20 auf malignen B-Zellen gegenüber gesunden B-Zellen fest und bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit. Weiterhin wurden CD20 negative Subpopulationen entdeckt, die nach Absetzen der Therapie durch Zellen, die CD20 exprimierten, ersetzt wurden [10].

Ob die CD20 Expression im Krankheitsverlauf abnimmt (siehe Abb. 4.16, S. 63) kann nicht genau bestimmt werden, da die Fallzahl von drei Binet-C-Erkrankten gering ist und sich alle diese Patienten unter Therapie befanden (Daten nicht aufgeführt). Die Klärung dieser Fragen durch weitere Untersuchungen und klinische Studien wäre sehr interessant.

Als zweites differentiell exprimiertes Gen wurde I $\kappa$ B $\alpha$  (Mad-3) entdeckt. Die gefundene Sequenz war zu 80 % homolog zur Sequenz des I $\kappa$ B $\alpha$ -Gens. Nach A. Lofquist et al. ist MAD-3 ein auf dem Chromosom 14 lokalisiertes Gen, welches das Protein I $\kappa$ B $\alpha$  kodiert [20]. I $\kappa$ B $\alpha$  hat im zellulären Ablauf der Apoptose eine zentrale Funktion im Zusammenhang mit NF- $\kappa$ B.

Es wurde entdeckt, dass NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort auf Stressfaktoren spielt, wie z.B. TNF- $\alpha$  [21-23]. NF- $\kappa$ B besteht aus Homo- und Heterodimeren der Untergruppen p50, p52, RelA, RelB und cRel, welche sich strukturell durch eine N-terminale-Region gleichen. Diese wird Rel-homologe Domain (RHD) genannt, sie beinhaltet wichtige Sequenzen für die DNA-Bindung und wird für die Interaktion mit dem NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B benötigt [24-27]. In den meisten Zellformen liegt inaktiviertes NF- $\kappa$ B als Komplex mit I $\kappa$ B vor. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist an die Dissoziation von I $\kappa$ B gekoppelt, welches dafür an zwei N-terminalen Serinresten durch eine I $\kappa$ B Kinase (IKK) phosphoryliert wird [28]. Der freie Rel/NF- $\kappa$ B Komplex kann dann in den Nukleus einwandern und an DNA binden. NF- $\kappa$ B partizipiert in der Transaktivierung verschiedener Gene, wie z.B. Entzündungszytokine, MHC-Proteine und Zell-Anheftungs-Moleküle [29]. Induktion von NF- $\kappa$ B schützt Zellen vor Apoptose, die durch Stoffe wie z.B. TNF- $\alpha$ , Chemotherapie und ionisierende Strahlung ausgelöst werden kann [23].

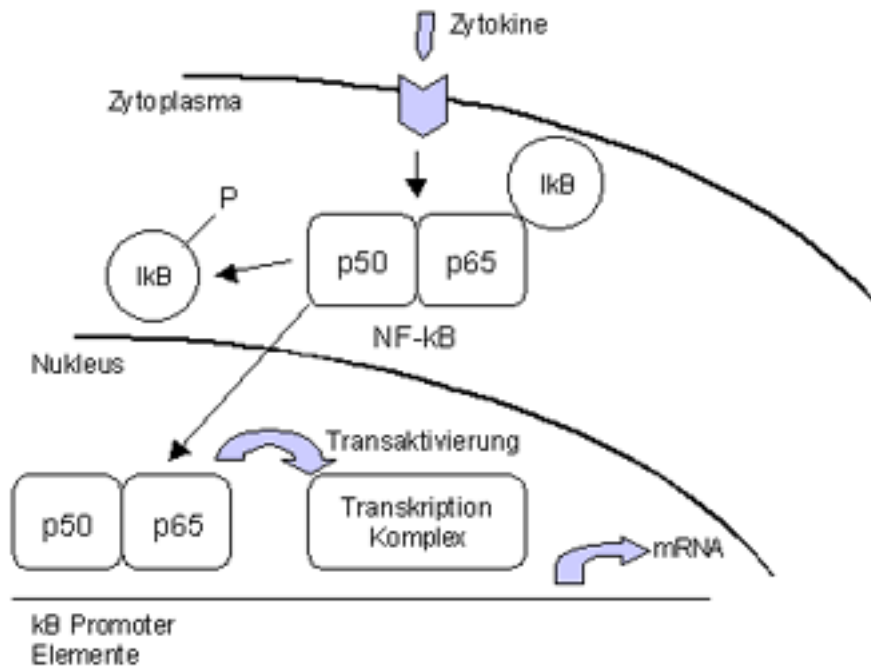


Abb. 5.2: Schema der Degradierung/Phosphorylierung von IκB, Aktivierung von NF-κB und Transaktivierung von Genen

Nach Wang et al. scheint der Mechanismus auf der einen Seite über die Induktion von anti-apoptotischen-Genen, wie c-IAP1, c-IAP2, bcl-x<sub>L</sub> und bfl-1 zu geschehen [30]. Auf der anderen Seite stellen Bash et al. Mechanismen dar, in denen NF-κB die Transkription von Cyclin D1 aktiviert, wobei Cyclin D1 ein Regulator im Zellzyklus von der G1 zur S Phase darstellt [31].

NF-κB und IκB interagieren über die „ankyrin repeats“ des IκBs und der RHDs der NF-κB. Die IκB Familie besteht aus IκBα, IκBβ, IκBε, Bcl-3, p105 und p100, [32, 33] wobei IκBα und IκBβ die Bekanntesten sind. Beide haben gleiche Anbindungsstellen für Phosphor in der NH<sub>2</sub> Sequenz, an der die Signal induzierte Degradation stattfindet und interagieren mit gleicher Spezifität mit dem RelA und cRel Komplex (RHD) [34,35].

Die Degradation von IκBα wird durch Phosphorylierung von IκBα ausgelöst. Dadurch wird IκBα von seiner inhibitorischen Bindung an NF-κB frei und NF-κB wird aktiv [36].

Die IκBα-Kinase besteht aus mindestens zwei Einheiten, IKKα und IKKβ und einem angeschlossenen Modulator, IKKγ. Nach Stimulierung der Zellen durch spezifische Agenzien, wie zum Beispiel TNF-α oder Interleukin-1, wird der IKK Komplex aktiviert, welcher daraufhin IκBα phosphoryliert.

Da I $\kappa$ B der Inhibitor von NF- $\kappa$ B ist und NF- $\kappa$ B anti-apoptotische Effekte hat, könnte eine hohe I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression eine erhöhte Apoptoserate bzw. der Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  möglicherweise eine Verringerung der Apoptoserate zur Folge haben. E. Cabannes et al. stellten fest, dass I $\kappa$ B $\alpha$ /MAD-3 als Tumorsuppressor-Gen fungiert, um die onkogene Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu kontrollieren [37].

In der vorliegenden Arbeit wurde entdeckt, dass B-Zellen von gesunden Probanden eine erhöhte Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA gegenüber den CLL-Kranken aufwiesen ( $p=0,009$ ). 10 B-Zell-Proben von Normalspendern wurden mit 11 Patienten auf die Expression des I $\kappa$ B $\alpha$ /MAD-3 Gens untersucht (Abb. 4.19, S. 65).

Es ist anzunehmen, dass die Feinregulierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität am ehesten durch den unterschiedlichen Phosphorylierungszustand von I $\kappa$ B $\alpha$  entschieden wird. Zusätzlich wäre es jedoch möglich, dass die differentielle Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA einen Einfluß auf die Dysregulation der Apoptose in B-CLL-Zellen haben könnte.

Interessanterweise wurden auch mögliche Korrelationen mit den verschiedenen Binet-Stadien festgestellt (Abb. 4.20, S. 65). Im Vergleich der Mittelwerte der jeweiligen Gruppen wiesen Patienten im Binet B Stadium gegenüber Patienten mit Binet A eine geringere Expression des I $\kappa$ B/MAD-3 Gens auf. Dieses Ergebnis bestätigt den theoretischen Ansatz, dass ein Fortschreiten der Erkrankung mit einer verringerten Apoptoserate korrelieren könnte. Gegensätzlich dazu erschien die erhöhte Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  (Mad-3) bei Patienten im Stadium der Binet-C-Erkrankung. Ob generell im fortgeschrittenen Stadium der CLL die I $\kappa$ B Expression und somit die Apoptoserate wieder leicht ansteigen, müssten genauere Untersuchungen beweisen. Die geringe Fallzahl von 3 Patienten im Binet C Stadium lässt eine genauere Aussage nicht zu.

Die Rolle des I $\kappa$ B in der Regulation der Apoptose wurde für andere Zellarten ausgiebig untersucht. S. Haskill et al. klonierten das I $\kappa$ B kodierende Gen Mad-3 aus einer Monozyten-Genbank [38]. Verschiebungen in der regulären Aktivität von NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B wurden nach R. Bargou bei Hodgkin-Lymphomen entdeckt [39] und auch bei T-Zell Leukämien von T. McKinsey et al. diskutiert [40]. NF- $\kappa$ B wurde ursprünglich 1986 als Transkriptionsfaktor der B-Zellen identifiziert [41] und eine Schlüsselrolle von NF- $\kappa$ B in der Apoptose der B-Zellen wurde 1997 von G. Sonenshein festgestellt

[42]. Anti-apoptotische und zum Teil auch pro-apoptotische Eigenschaften von NF- $\kappa$ B wurden nach M. Barkett für viele andere Gewebearten untersucht [28].

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse geben über den erstmaligen Nachweis der verminderten Expression von I $\kappa$ B-cDNA für die B-CLL einen Ansatz für die mögliche Pathophysiologie von malignen B-Lymphozyten.

Durch die zentrale Rolle des I $\kappa$ B $\alpha$  in der B-CLL könnten Blockaden der I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung eine mögliche neue Therapieoption darstellen. Durch Blockade könnte der I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B Komplex nicht getrennt werden; dadurch bliebe NF- $\kappa$ B inaktiv und könnte nicht anti-Apoptotische Faktoren auslösen. Es wurden durch J. Epinat et al. Moleküle nachgewiesen, die die Phosphorylierung und damit die Degradierung von I $\kappa$ B verhindern [43]. Dadurch kann NF- $\kappa$ B nicht aktiviert werden. Zu diesen I $\kappa$ B-Degradations-Blockern gehören Stickstoffoxid (NO) [44], oxidiertes LDL (ox-LDL) [45], 4-Hydroxynonenal (HNE) [46], Östrogen (E2) [47] und Prostaglandin A [48]. Weiterhin gibt es artifizielle Blocker, wie die pharmakologischen Moleküle BAY-117821 und BAY-117083 [49]. Andere Stoffe inhibieren NF- $\kappa$ B durch eine Hochregulierung der I $\kappa$ B Expression, z.B.  $\beta$ -amyloides Peptid [50]. Diese Stoffe sind eine Auswahl von mehreren I $\kappa$ B-Degradations-Blockern. Möglicherweise könnten diese Stoffe die Aktivität von NF- $\kappa$ B verhindern und dadurch Therapiemöglichkeiten in der Behandlung der CLL darstellen.

Da in dieser Arbeit differentielle Transkripte auf mRNA-Ebene untersucht wurden, konnte zwar I $\kappa$ B $\alpha$ -cDNA nachgewiesen werden, aber nicht das entsprechende Protein. Dies muss in weiteren Studien noch nachgewiesen werden.

In dieser Doktorarbeit wurden mittels der SSH-Genbanken für die B-CLL erstellt und spezifische Gene detektiert. Diese Gentranskripte könnten zukunftsweisend in der „Microarray“-Technik eingesetzt werden und damit die Diagnose der CLL erleichtern. Die Ergebnisse von CD20 und I $\kappa$ B $\alpha$  ermöglichen interessante Theorien über die Pathophysiologie von B-Zellen. Die weitere Erforschung der Apoptose in B-Zellen im Zusammenhang mit I $\kappa$ B und NF- $\kappa$ B könnten Grundlagen für zukünftige Therapiekonzepte der B-CLL schaffen.

## 6 Zusammenfassung

Die B-CLL ist eine niedrigmaligne Erkrankung, die im höheren Lebensalter auftritt und für die es weiterhin keine dauerhaft kurative Therapie gibt.

Die Erforschung der genetischen Grundlagen dieser Krankheit könnte Erkenntnisse über die Funktionsmechanismen und neue Diagnose- und Therapieansätze erbringen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Genbank von CLL-Patienten bzw. gesunden Spendern zu erstellen, um Gene, die für die Entstehung der Erkrankung mitverantwortlich sein könnten, zu identifizieren.

Die subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) wurde als Methode eingesetzt, um cDNA-Mischungen zu generieren, in denen differentielle Gene angereichert wurden.

In dieser Arbeit wurden drei differentielle Gene identifiziert. Eines dieser Gene kodiert den Oberflächenmarker CD5, der bei CLL-Erkrankten stärker exprimiert wurde. Da CD5 ein für die B-CLL relativ spezifischer Marker ist, bestätigte dieses Ergebnis die Qualität der Genbank.

Mit Hilfe der SSH wurde ein Verlust der Expression der cDNA für den Oberflächenmarker CD20 bei CLL-Erkrankten nachgewiesen. CD20 ist möglicherweise ein Kalziumkanal und wird als Ziel des anti-CD20-Antikörpers Rituximab verwendet. Der Verlust von CD20 im Verlauf der Erkrankung konnte in dieser Arbeit angedeutet werden.

Weiterhin wurde eine verringerte Expression von cDNA für  $I\kappa B\alpha$  (Mad-3) bei CLL-Patienten entdeckt. Der Transkriptionsfaktor  $I\kappa B\alpha$  spielt im zellulären Ablauf der Apoptose eine wichtige Rolle. Phosphoryliertes  $I\kappa B\alpha$  inhibiert die Wirkung von NF- $\kappa B$ . Eine Reduktion von  $I\kappa B\alpha$ -cDNA könnte ebenfalls die Funktion von NF- $\kappa B$  beeinflussen. Dieses Ergebnis könnte auch für zukünftige immuntherapeutische Ansätze von Bedeutung sein. Weiterhin sind die nachgewiesenen Gene interessant für die Technik des „DNA-Microarrays“. Diese schnelle Methode ermöglicht kostengünstige Diagnosen und könnte daher eine zukunftsweisende Alternative zu herkömmlichen Ansätzen bieten.

In der vorliegenden Arbeit konnten differentielle Transkripte auf mRNA-Ebene bei B-CLL-Erkrankten und gesunden Kontrollen festgestellt und untersucht werden. Die Ergebnisse geben neue Einsichten über Onkogene und Tumorsuppressorgene in der B-CLL und eröffnen zukünftige immuntherapeutische Ansätze.

## 7 Verzeichnis der Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad in Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Binet	Einteilung der Erkrankungsstadien der B-CLL, 1981
Buffy coat	Substrat gesunder Blutspender
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DotBlot	Screeningmethode von differentiellen Genen
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
EtBr	Ethidium Bromid
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
IgG	Imunglobulin G
J.	Jahre
Kg	Kilogramm
L	Liter
LK	Lymphknoten
M	Morbus
max.	Maximal
mg	Milligramm
min.	Minute
mmol	Millimol
Ng	Nanogramm
o.g.	Oben genannt
Pat.	Patient
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
Sek.	Sekunden
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
Vol.	Volumen

## Literatur

- 1; Classen, Diehl, Kochsiek; Innere Medizin; Urban & Schwarzenberg; 1998;
- 2; G. Dighiero, T. Kipps, M. Ferrarini; What is the CLL B-Lymphocyte?; Leukemia and Lymphoma; 1999; *Vol. 22*;
- 3; M. Rummel; Leukämie; Onkologe; 1998; *4:808-819*;
- 4; S. Zupo, R. Massara, M. Ferrarini; Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD; Blood; 2000; *Vol. 95*;
- 5; R. Bannerji, J. Byrd; Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia; Current Opinion Oncology; 2000; *12:22-29*;
- 6; P. Mitrou, F. Länger; Atlas der Knochenmark-Neoplasien; TUZ Rhein-Main e.V., Frankfurt/Main; 2000;
- 7; G. Meinhardt, C. Wendtner, M. Hallek; Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival; Journal Mol. Med.; 1999; *77: 282-293*;
- 8; F. Caligaris-Cappio; Biology of chronic lymphocytic leukemia; Rev. Clin. Exp. Hematol.; 2000; *4:5-21*;
- 9; C. Pepper, T. Hov, D. Bentley; Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation in vitro apoptosis and clinical resistance; British Journal Cancer; 1997; *76:935-938*;
- 10; T. Pickartz, F. Ringel, M. Wedde, D. Schoeler, F. Schriever; Selection of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Subsets by Therapy with Anti-CD20 Monoclonal Antibody Rituximab; Experimental Journal of Hematology; 2001;
- 11; O. von Stein, W. Thies, M. Hofmann; A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes; Nucleic Acids Research; 1997; *No. 13*;
- 12; L. Zhang, R. Cilley, M. Chinoy; Suppression Subtractive Hybridization to Identify Gene Expressions in Variant and Classic Small Cell Lung Cancer Cell Lines; Journal of Surgical Research; 2000; *93*;

- 12; L. Diatchenko, Y. Lau, A. Campbell, P. Siebert; Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific probes and libraries;  
Proc. Natl. Acad. Sci.; 1996; *Vol. 93*;
- 13; N. Gurskaya, L. Diatchenko, A. Chenchik, E. Sverdlov; Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain reaction: Cloning of Jurkat Cell Transcripts induced by Phytohemagglutinin and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate;  
Analytical Biochemistry; 1996; *No. 0334*;
- 14; C. Vedoy, M. Bengtson, M. Sogayar; Hunting for differentially expressed genes; Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 1999; *32*; 877-884
- 16; K. Porkka, T. Visakorpi; Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array; Journal of Pathology; 2001; *193*;
- 17; H. Jin, X. Cheng, C. Huang; Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues; BioTechniques; 1997; *23*;
- 18; U. Winkler, M. Jensen, O. Manzke, A. Engert; Cytokine-Release Syndrome in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia and High Lymphocyte Counts After Treatment With an Anti-CD20 Monoclonal Antibody; Blood; 1999; *No 7*;
- 19; M. Polyak, S. Taylor, J. Deans; Identification of a Cytosolic Region of CD20 Required for its Redistribution to a Detergent-Insoluble Membrane Compartment; Journal of Immunology; 1998;
- 20; A. Lofquist, K. Mondal, S. Haskill; Transcription-Independent Turnover of I $\kappa$ B during Monocyte Adherence: Implications for a Translational Component Regulating I $\kappa$ B/MAD-mRNA Levels; Molecular and Cellular Biology; 1995;
- 21; V. Antwerp, D. Martin, S. Kafri; Suppression of TNF- $\alpha$  induced apoptosis by NF- $\kappa$ B; Science; 1996; *274*;
- 22; Z. Liu, H. Hsu, M. Karin; Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- $\kappa$ B activation prevents cell death; Cell; 1996; *87*;

- 23; A. Beg, D. Baltimore; An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha induced cell death;  
Science; 1996; 274;
- 24; T. Gilmore; Introduction: the Rel/NF-kappa B signal transduction pathway;  
Cancer Biology; 1997; 8:61-62;
- 25; S. Whiteside, S. Israel; IkappaB proteins: structure, function and regulation;  
Cancer Biology; 1997; 8:75-82;
- 26; A. Israel; A role for phosphorylation and degradation in the control of NF-kappa B activity;  
Trends Genet.; 1995; 11:203-205;
- 27; A. Beg, A. Baldwin; The IkappaB proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors;  
Genes Dev.; 1993;
- 28; M. Barkett, T. Gilmore; Control of apoptosis by Rel/NF-kappa B transcription factors;  
Oncogene; 1999; 18;
- 29; P. Baeurle, D. Baltimore; NF-kappaB: Ten years later;  
Cell; 1996; 87, 13-20;
- 30; C. Wang, M. Mayo, R. Korneluk, A. Baldwin; NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation;  
Science; 1998; 281: 1680;
- 31; J. Bash, W. Zong, C. Gelinas; ; Mol. Cell. Biol.; 1997;
- 32; S. Whiteside, S. Israel; IkappaB proteins: structure, function and regulation;  
Cancer Biol.; 1997; 8: 75-82;
- 33; A. Israel; A role for phosphorylation and degradation in the control of NF-kappaB activity;  
Trends Genet.; 1995; 11: 203-205;
- 34; J. Thompson, R. Phillips, H. Erdument-Bromage, S. Gosh; IkappaB regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B;  
Cell; 1995; 80:573-582;
- 35; Z. Chu, T. McKinsey, D. Ballard; Basal Phosphorylation of the PEST domain in IkappaB regulates its functional interaction with the c-rel prot-oncogene product; Mol. Cell. Biol.; 1996; 16: 5974-5984;

- 36; M. Karin; ;  
Oncogene; 1999; 18;
- 37; E. Cabannes, G. Khan, F. Aillet, R. Hay;  
Oncogene; 1999; 18;
- 38; S. Haskill, A. Beg, A. Baldwin; Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity;  
Cell; 1991; 65;
- 39; R. Bargou, F. Emmerich, B. Dorken;  
J. Clin. Invest.; 1997; 100;
- 40; T. McKinsey, J. Brockman, D. Ballard; Inactivation of I kappa B beta by the tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1: a potential mechanism for constitutive induction of NF-kappa B;  
Mol. Cell Biol.; 1996;
- 41; R. Sen, D. Baltimore;  
Cell; 1986; 47;
- 42; G. Sonenshein; ;  
Semin. Cancer Biol.; 1997; 8;
- 43; J. Epinat, T. Gilmore; Diverse agents act as a multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappa B signal transduction pathway;  
Oncogene; 1999; 18;
- 44; J. Matthews, C. Botting, M. Panico, R. Hay; ;  
Nucleic Acids Res.; 1996; 24;
- 45; K. Brand, T. Eisele, D. Neumeier; ;  
Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol.; 17;1901-1909
- 46; S. Page, C. Fischer, B. Baumgartner, K. Brand;  
J. Biol. Chem.; 274;
- 47; W. Sun, E. Keller, W. Ershler;  
Biochem. Biophys. Res. Comm.; 244;691-695
- 48; A. Rossi, G. Elia, M. Santoro;  
Proc. Natl. Acad. Sci. 94;746-750
- 49; J. Pierce, R. Schoenleber, M. Gerritsen;  
J. Biol. Chem.; 1997; 272;
- 50; K. Bales, Y. Du, R. Dodel, S. Paul;  
Brain Res. Mol.; 1998; 57;

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst zu haben, dass die vorliegende Dissertaion auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die dafür benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 10.01.2003

Max Schlaak

---

## **Danksagung**

Im Folgenden möchte ich mich bei den aufgeführten Personen für Ihre Unterstützung und die vielen wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. med. Folke Schriever, Facharzt für Hämatologie und Onkologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, besonders freundlich für die Überlassung des Themas danken. Ich bin sehr froh, dass durch die intensive Betreuung von Herrn Schriever mit seinen wertvollen Hinweisen und kritischen Bemerkungen diese Arbeit überhaupt erst möglich war.

Spezieller Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Marianne Wedde, die mir bei der experimentellen Arbeit mit ihrer Geduld und Kompetenz jederzeit zur Seite stand. Durch ihre intensive Betreuung war jedes Problem in der methodischen Arbeit zu bewältigen und ich bin sehr froh, dass ich mit ihr zusammenarbeiten durfte.

Außerdem möchte ich mich bei Dipl. biol. Frauke Ringel und Dr. med. Dagmar Schoeler bedanken, die ich jederzeit um Rat fragen konnte und die durch ihre Fröhlichkeit eine herzliche Atmosphäre schufen, die sehr angenehm zum Arbeiten war.

Vielen Dank für die Unterstützung der Akademischen Verwaltung der Charité - Referat Forschung, Frau Hanft - und des Prodekans für Forschung Prof. Dr. C. Frömmel durch ein halbjähriges Forschungsstipendium.

Für das Sammeln der Blutproben war ich auf die Mithilfe der Mitarbeiter der hämatologischen Ambulanz, der hämatologischen Station und der Blutbank am Campus Virchow-Klinikum der Charité angewiesen. Stellvertretend möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Salama und Prof. Dr. med. Huhn für die Unterstützung bedanken.

Abschließend danke ich meinen Freunden für die vielen wertvollen Stunden während meines Studiums, meiner Familie für die stetige Fürsorge um mich und besonders meiner Mutter, die durch ihre Liebe und Kraft mir das Studium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht hat.

## Lebenslauf

MAX SIMON SCHLAAK

### Angaben zur Person

Geburtsdatum und –ort: 22.02.1977, Berlin

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung:

1983 - 1989 Grundschule unter den Kastanien in Lichterfelde

1989 - 1996 Lilienthal - Oberschule mit Abschluß Allgemeine Hochschulreife

seit 1996 Studium der Humanmedizin an der FU-Berlin

1998 Ärztliche Vorprüfung

1999 Famulatur im Deutschen Herzzentrum bei Prof. Hetzer

1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000 Doktorarbeit bei PD Dr. Schriever, Hämatologie, Charité,  
Campus Virchow-Klinikum, HU

2000 Hochschulwechsel an die HU-Berlin

2001 Famulatur in der Anästhesie, Virchow-Klinikum bei Prof. Klapp

2001 Famulatur in der Praxis für ambulante Anästhesie und Schmerztherapie bei  
Dr. med. Jansen

2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 Erstes Tertial Praktisches Jahr Dermatologie, Charité, HU

### Beruflicher Werdegang:

1997 - 1998 studentische Aushilfe im Insitut für Pathologie im Ev.  
Waldkrankenhaus, Prof. H. Pickartz

1998 - 1999 studentische Aushilfe bei Dr. Schultz/Dr. Schultebraucks/Dr. Müller-Pawloski,  
Lungenarztpraxis in Lichterfelde

Betreuung einer Budesonid-Easyhaler/Turbohaler Studie der Firma Orion  
Pharma

2001 Interviewtätigkeit zum Aufbau einer Syndromdatenbank zur Erfassung  
erblicher Krankheiten der Firma InGene

2001- 2002 studentische Hilfskraft an der Charité, Mitte; Institut für

Pharmakoepedemiologie / Institut für klinische Pharmakologie;

Interviewtätigkeit zur Berliner Fall-Kontroll Studie seltener Bluterkrankungen

### Sonstiges:

1993 - 1994 Auslandsaufenthalt in den USA

Mitarbeit im Deutschen Famulantenaustausch (DFA)