

# **Faktoren, die die Expression von Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen regulieren**

**Inaugural Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Christa Henger**  
aus Fliesteden

Düsseldorf, 2008



Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität

**Referent:** Priv. Doz. Dr. M. Uhrberg

**Koreferent:** Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2008

*Für meine Eltern*

Wenn man eine Katze  
auseinandernehmen will, um zu  
sehen, wie sie funktioniert, hat  
man als erstes eine nicht  
funktionierende Katze in den  
Händen.

Douglas Adams

Wissenschaftliche Forschung läuft immer darauf hinaus, dass es plötzlich mehrere Probleme gibt, wo es früher ein einziges gegeben hat.

*Norman Mailer*

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis..... V - VII**

**1 Einleitung..... 1**

**1.1 Das Immunsystem..... 1**

**1.2 Effektorzellen der angeborenen Immunität..... 1**

1.2.1 Natürliche Killerzellen..... 1

1.2.2 Zytotoxische T-Lymphozyten..... 2

**1.3 Rezeptoren auf NK-Zellen..... 3**

**1.4 Steuerung der NK-Zellaktivität durch aktivierende und inhibierende  
Rezeptoren..... 8**

**1.5 NK-Rezeptoren auf T-Zellen..... 8**

**1.6 Effektormechanismen..... 9**

**2 Zielsetzung..... 11**

**3 Material und Methoden..... 12**

**3.1 Material..... 12**

3.1.1 Laborgeräte..... 12

3.1.2 Verbrauchsmaterialien..... 13

3.1.3 Chemikalien..... 15

3.1.4 Zelllinien..... 16

3.1.5 Medien für die Zellkultur..... 16

3.1.6 Puffer und Lösungen für die Zellkultur..... 17

3.1.7 Reagenzien für die Zellkultur..... 17

3.1.8 Zytokine..... 17

3.1.9 Antikörper für Zellisolierung und FACS-Analyse..... 17

3.1.10 Antikörpergekoppelte Microbeads für Magnetische Zellseparation..... 18

3.1.11 Antikörper für Western Blot..... 18

3.1.12 Antikörper für Chromatin-Immunopräzipitation..... 18

3.1.13 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie..... 18

3.1.14 Puffer und Lösungen für die Proteinchemie..... 19

3.1.15 Reaktions-„Kits“..... 20

3.1.16 Klonierung und Transformation..... 21

3.1.17 Vektoren..... 21

3.1.18 Restriktionsenzyme..... 21

3.1.19 PCR..... 22

3.1.20 cDNA-Synthese..... 22

3.1.21 DNA Gelelektrophorese..... 22

3.1.22 Quantitative PCR/Real-time PCR..... 22

3.1.23 Radioaktiv marktierte Sonden..... 22

3.1.24 Oligonukleotide..... 23

3.1.25 Software..... 25

3.1.26 www-Seiten..... 25

**3.2 Methoden..... 26**

3.2.1 Zellkulturmethoden..... 26

3.2.1.1 Zelllinien..... 26

3.2.1.2 Zellen aus humanem Blut..... 26

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| 3.2.1.3     | Zellzahlbestimmung.....  | 26 |
| 3.2.1.4     | Durchflusszytometrie.....  | 27 |
| 3.2.1.5     | Isolierung von Zellen.....   | 27 |
| 3.2.1.6     | Magnetische Zellseparation – MACS.....                               | 28 |
| 3.2.1.7     | Kultivierung von Zellen.....   | 29 |
| 3.2.1.7.1   | Kultivierung von Zelllinien.....                                     | 29 |
| 3.2.1.7.2   | Kultivierung von NK-Zellen.....                                      | 29 |
| 3.2.1.7.2.1 | Kultivierung von NK-Zellen mit IL-15 und IL-21.....                  | 30 |
| 3.2.1.7.3   | Kultivierung von Zellen mit 5-Aza-2'-cytidin und Trichostatin A..... | 30 |
| 3.2.2       | Molekularbiologische Methoden.....                                   | 30 |
| 3.2.2.1     | Isolierung von RNA.....  | 30 |
| 3.2.2.2     | Isolierung von RNA mittels Cäsiumchlorid-Gradient.....               | 31 |
| 3.2.2.3     | Isolierung von mRNA.....   | 32 |
| 3.2.2.4     | Bestimmung der RNA-Konzentration.....                                | 32 |
| 3.2.2.5     | Überprüfung der Integrität der RNA.....                              | 33 |
| 3.2.2.6     | Herstellung von cDNA für PCR.....                                    | 33 |
| 3.2.2.7     | PCR zur Expressionskontrolle.....                                    | 34 |
| 3.2.2.8     | Semiquantitative PCR.....  | 34 |
| 3.2.2.9     | Analytische Agarosegelelektrophorese.....                            | 34 |
| 3.2.3       | Subtraktive cDNA-Banken/PCR-Select Methode.....                      | 35 |
| 3.2.3.1     | cDNA-Synthese.....   | 38 |
| 3.2.3.2     | Zweitstrangsynthese.....   | 39 |
| 3.2.3.3     | Restriktionsverdau mit <i>RsaI</i> .....                             | 41 |
| 3.2.3.4     | Kontrolle des Restriktionsverdaus.....                               | 41 |
| 3.2.3.5     | Adaptorligation.....   | 42 |
| 3.2.3.6     | Hybridisierung der Adapteren.....                                    | 42 |
| 3.2.3.7     | Kontrolle der Adaptorligation/Ligationseffizienztest.....            | 42 |
| 3.2.3.8     | Hybridisierung.....  | 44 |
| 3.2.3.9     | 1. PCR nach Hybridisierung.....                                      | 45 |
| 3.2.3.10    | 2. PCR nach Hybridisierung.....                                      | 46 |
| 3.2.3.11    | Ligation der PCR-Produkte.....                                       | 46 |
| 3.2.3.12    | Subtraktionseffizienzkontrolle.....                                  | 48 |
| 3.2.3.13    | Transformation in <i>E. coli</i> .....                               | 49 |
| 3.2.3.14    | Blau-weiß-Selektion.....   | 49 |
| 3.2.3.15    | Analytische Plasmidpräparation.....                                  | 50 |
| 3.2.3.16    | Präparative Plasmidpräparation.....                                  | 50 |
| 3.2.3.17    | Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....                              | 51 |
| 3.2.3.18    | Kolonie-PCR.....   | 51 |
| 3.2.3.19    | Reinigung der Nested PCR-Produkte.....                               | 52 |
| 3.2.3.20    | DNA-Sequenzierung.....   | 53 |
| 3.2.3.21    | Auswertung der Sequenzen.....  | 53 |
| 3.2.3.22    | Überprüfung der differentiellen Expression.....                      | 54 |
| 3.2.4       | Real-time PCR.....   | 56 |
| 3.2.4.1     | TaqMan™-Analysen.....  | 56 |
| 3.2.4.2     | Erstellung von Schmelzkurven.....                                    | 57 |
| 3.2.5       | Chromatinimmunopräzipitation (ChIP).....                             | 58 |
| 3.2.5.1     | Durchführung der ChIP-Experimente.....                               | 58 |
| 3.2.5.2     | Klonierung der präzipitierten DNA aus den ChIP-Experimenten.....     | 60 |
| 3.2.6       | Transfektion von humanen Zellen.....                                 | 60 |
| 3.2.6.1     | Vektor pcDNA/PLZF(2,1).....  | 60 |
| 3.2.6.2     | Nukleofektion™.....  | 61 |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.7 Proteinchemische Methoden.....  | 62         |
| <b>4 Ergebnisse.....</b>  | <b>65</b>  |
| <b>4.1 NK3.3- und Jurkat-Zellen.....</b>  | <b>65</b>  |
| 4.1.1 RNA-Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA.....   | 65         |
| 4.1.2 mRNA-Isolierung.....  | 66         |
| 4.1.3 cDNA-Synthese.....  | 66         |
| 4.1.4 Restriktionsverdau mit <i>Rsal</i> .....  | 67         |
| 4.1.5 Ligationseffizienztest.....   | 67         |
| 4.1.6 Subtraktionseffizienztest.....  | 68         |
| 4.1.7 Subtraktionseffizienzkontrolle mit G3PDH.....   | 69         |
| 4.1.8 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene.....  | 70         |
| 4.1.9 Expressionsanalyse mit PCR und Real-time PCR.....   | 76         |
| <b>4.2 NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut.....</b>  | <b>78</b>  |
| 4.2.1 Denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....  | 79         |
| 4.2.2 cDNA-Synthese für NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....  | 79         |
| 4.2.3 Subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....  | 81         |
| 4.2.4 Kontrolle des <i>Rsal</i> -Verdau der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....   | 81         |
| 4.2.5 Ligationseffizienztest der Subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....  | 81         |
| 4.2.6 Subtraktionseffizienztest der Subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....   | 82         |
| 4.2.7 Subtraktionseffizienzkontrolle mit G3PDH für die subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....                                       | 84         |
| 4.2.8 Subtraktionseffizienzkontrolle mit TCR C $\beta$ für die subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....                               | 85         |
| 4.2.9 Differential screening der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....  | 86         |
| 4.2.10 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene aus der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....                            | 88         |
| 4.2.11 Kontrolle der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen: HLA-Typisierung.....   | 96         |
| 4.2.12 NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen: Genexpressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Array.....   | 97         |
| 4.2.13 NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen: Expressionsanalyse der differentiell exprimierten Sequenzen aus den Subtraktiven cDNA-Banken mit Real-time PCR...98 |            |
| <b>4.3 Kultivierte NK-Zellen (IL-2).....</b>  | <b>102</b> |
| 4.3.1 RNA-Isolierung und Denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA....  | 102        |
| 4.3.2 cDNA-Synthese.....  | 103        |
| 4.3.3 Kontrolle des <i>Rsal</i> -Verdau.....  | 103        |
| 4.3.4 Ligationseffizienztest.....   | 103        |
| 4.3.5 Subtraktionseffizienztest.....  | 104        |
| 4.3.6 Subtraktionseffizienzkontrolle.....   | 105        |
| 4.3.7 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene.....  | 105        |
| <b>4.4 Kultivierte NK-Zellen (IL-15 und IL-21).....</b>   | <b>108</b> |
| 4.4.1 RNA Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA.....   | 108        |
| 4.4.2 cDNA-Synthese.....  | 109        |
| 4.4.3 Kontrolle des <i>Rsal</i> -Verdau.....  | 109        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.4.4      | Ligationseffizienztest.....   | 109        |
| 4.4.5      | Subtraktionseffizienztest.....  | 110        |
| 4.4.6      | Subtraktionseffizienzkontrolle mit G3PDH.....   | 111        |
| 4.4.7      | Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene.....  | 112        |
| 4.4.8      | Expressionsanalyse mit Real-time PCR.....   | 118        |
| <b>4.5</b> | <b>PLZF.....</b>  | <b>123</b> |
| 4.5.1      | Expression von PLZF in NK-, CD8 <sup>+</sup> T-, CD34 <sup>+</sup> - und KG1-Zellen.....                                      | 123        |
| 4.5.2      | Kultivierung von NK-Zellen aus peripherem Blut.....   | 124        |
| 4.5.3      | Expression von PLZF regulierten Genen in NK-Zellen.....   | 126        |
| 4.5.4      | Expression von Histondeacetylasen in kultivierten NK-Zellen.....  | 127        |
| 4.5.5      | Expression von PLZF auf Proteinebene.....   | 129        |
| <b>4.6</b> | <b>ChIP – Chromatin-Immunopräzipitation.....</b>  | <b>130</b> |
| <b>4.7</b> | <b>ChIP and clone – Klonierung der an PLZF bindenden DNA.....</b>   | <b>132</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Überexpression von PLZF in NK-Zellen und Zelllinien.....</b>   | <b>134</b> |
| <b>4.9</b> | <b>Regulation der Expression von PLZF.....</b>  | <b>136</b> |
| <b>5</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>138</b> |
| 5.1        | NK3.3- und Jurkat-Zellen.....   | 138        |
| 5.2        | NK-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut.....  | 139        |
| 5.3        | Mit IL-2, IL-15 und IL-21 kultivierte und frisch isolierte NK-Zellen.....   | 142        |
| 5.4        | Expression von <i>PLZF</i> in verschiedenen Zellen und Zelllinien.....  | 146        |
| 5.5        | Expression von PLZF-regulierten Genen in NK-Zellen.....   | 147        |
| 5.6        | Expression von Histondeacetylasen in kultivierten NK-Zellen.....  | 148        |
| 5.7        | Expression von PLZF auf Proteinebene: NK-Zellen enthalten viel PLZF-Protein, das während der Kultivierung reduziert wird..... | 148        |
| 5.8        | Chromatin-Immunopräzipitation: Bindung von PLZF an PLZF-regulierte Gene in NK-Zellen.....                                     | 149        |
| 5.9        | Identifizierung eines PLZF-Zielgens: ITGB4 (CD104).....   | 150        |
| 5.10       | Überexpression von PLZF in NK3.3.....   | 152        |
| 5.11       | Regulation der Expression von PLZF.....   | 153        |
| <b>6</b>   | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>155</b> |
|            | <b>Abstract.....</b>  | <b>156</b> |
| <b>7</b>   | <b>Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>157</b> |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| ds cDNA            | Doppelstrang cDNA (double strand cDNA)                                      |
| ss cDNA            | Einzelstrang cDNA (single strand cDNA)                                      |
| ADCC               | antikörperabhängige Zytotoxizität   |
| APC                | antikörperpräsentierende Zelle  |
| APS                | Ammoniumperoxodisulfat  |
| BSA                | Bovines Serum Albumin   |
| CD                 | Differenzierungscluster (cluster of differentiation)                        |
| CIAP               | Alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase)               |
| $C_t$              | Grenzyklus (threshold cycle)  |
| $\Delta C_t$       | $C_t$ bezogen auf interne Kontrolle   |
| $\Delta\Delta C_t$ | $\Delta C_t$ bezogen auf Kalibrator   |
| CTL                | zelluläre Zytotoxizität (cellular cytotoxicity)                             |
| dNTP               | Desoxyribonukleosidtriphosphat  |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat   |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid  |
| DNase              | Desoxyribonuklease  |
| DTT                | Dithiotreitol   |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure  |
| <i>E.coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat  |
| FACS               | Fluoreszenzvermittelte Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorting) |
| FCS                | fetales Kälberserum   |

|           |   |
|-----------|---|
| FITC      | Fluoresceinisothiocyanat  |
| G3PDH     | Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH)                     |
| HDAC      | Histondeacetylase   |
| HEPES     | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure                      |
| ICAM      | Zelladhäsionsmolekül (Intracellular cell adhesion molecule)         |
| Ig        | Immunglobulin   |
| IL        | Interleukin   |
| INF       | Interferon  |
| IPTG      | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid                          |
| ITAM      | immunoreceptor tyrosin-based activating motif                       |
| ITIM      | immunoreceptor tyrosin-based inhibiting motif                       |
| kb        | Kilobasen   |
| kDa       | Kilodalton  |
| KIR       | killer cell immunoglobulin-like receptor                            |
| KLR       | Lektinartige Rezeptoren (killer lectin-like receptor)               |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium  |
| MACS      | Magnetische Zellsortierung (magnetic cell separation)               |
| MHC       | Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) |
| MMLV      | Moloney Murine Leukemia Virus                                       |
| MOPS      | 2-N-Morpholinopropansulfonsäure                                     |
| mRNA      | messenger Ribonukleinsäure  |
| MW        | Molekulargewicht  |
| N-CAM     | Neurales Zelladhäsionsmolekül                                       |
| NCR       | Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren                                 |
| NKRP      | NK-Zell-Rezeptorprotein   |
| NK        | Natürliche Killerzellen   |

---

|            |  |
|------------|--|
| OD         | optische Dichte  |
| PBS        | Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)          |
| PCR        | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)              |
| PE         | Phycoerythrin  |
| PE-CY5     | Phycoerythrin-Cyanin-5   |
| PBMC       | periphere mononucleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells) |
| RNA        | Ribonukleinsäure   |
| RNase      | Ribonuklease   |
| rpm        | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)                         |
| RT         | Reverse Transkriptase  |
| RT         | Raumtemperatur   |
| RT-PCR     | Real-time PCR  |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)                        |
| SDS-PAGE   | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                |
| SMART      | switching mechanism at 5' end of RNA template                      |
| TBE-Puffer | Tris-Borat-EDTA-Puffer   |
| TE-Puffer  | Tris-EDTA-Puffer   |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                                 |
| Tris       | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                    |
| ü.N.       | über Nacht   |
| U          | Einheit (unit)   |
| UV         | Ultraviolett   |
| v/v        | Volumen pro Volumen (volume per volume)                            |
| w/v        | Gewicht pro Volumen (weight per volume)                            |
| X-Gal      | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid              |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus verschiedenen Arten von Zellen, die dem Schutz des Organismus durch Erkennen, Vernichten und Entfernen von nicht körpereigenen Substanzen oder Zellen, sowie entarteten körpereigenen Zellen dienen. Im lymphatischen Gewebe können die Zellen des Immunsystems transportiert und durch wechselseitigen Kontakt beeinflusst werden. In den zentralen lymphatischen Organen, dem Thymus und dem Knochenmark entsteht und reift ein Teil der Zellen des Immunsystems. In den peripheren lymphatischen Organen, der Milz, den Lymphknoten, den Tonsillen, den Peyer-Plaques und der Mukosa, treffen die verschiedenen Zellen aufeinander und werden so und durch den Kontakt mit körperfremden Substanzen zur Reaktion angeregt. Hierbei werden zwei Arten von Immunität unterschieden; die humorale Immunität, die von Antikörpern vermittelt wird und die zelluläre Immunität, die von zytotoxischen T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen vermittelt wird.

## 1.2 Effektorzellen der angeborenen Immunität

### 1.2.1 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen machen ca. 10 bis 20 % der mononucleären Zellen im peripheren Blut aus und können als Zellen charakterisiert werden, denen der T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD3 fehlt, während das neurale Zelladhäsionsmolekül CD56 (NCAM) immer vorhanden ist (Lanier et al., 1989; Miller, 2001). Die meisten der NK-Zellen im peripheren Blut exprimieren CD56 in geringem Ausmaß (CD56<sup>low</sup>) und sind CD16 positiv (CD16<sup>+</sup>) (Perussia, 1998). Diese CD56<sup>low</sup>-NK-Zellen besitzen ein höheres zytotoxisches Potential als die NK-Zellen, die CD56 stärker exprimieren (CD56<sup>high</sup>) (Cooper et al., 2001) und weisen im Gegensatz zu diesen eine Expression von Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (Killer Ig-like receptors, KIR) auf (Jacobs et al., 2001).

NK-Zellen exprimieren den low affinity Rezeptor für IL-2 (IL-2R $\beta$  und common  $\gamma$ -chain, CD122), CD56<sup>high</sup>-NK-Zellen exprimieren zusätzlich den high affinity IL-2 Rezeptor, IL-2R $\alpha$  (CD25) (Lozza und Perussia, 2004, Nagler et al., 1989). Ein geringer Teil der CD161<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen exprimiert CD8 $\alpha\alpha$ , wobei die CD8<sup>+</sup> -NK-Zellen genauso wie die CD8<sup>-</sup> -NK-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren können. Zur Typ 2 Zytokinproduktion sind aber nur die CD8<sup>-</sup> -NK-Zellen fähig (Loza et al., 2002). Adhäsionsmoleküle auf CD161<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen sind CD2 (Ligand CD58), CD11b/CD18 und CD244 (2B4, Ligand CD48) (Boles et al., 1999).

Anders als bei T- oder B-Zellen kommt es bei NK-Zellen nicht zu einem Rearrangement von Genen, wie bei Mäusen mit T- und B-Zelldefekten, die auf einem gestörten Gen-Rearrangement beruhen, gezeigt werden konnte. Bei diesen Tieren sind normal entwickelte NK-Zellen zu finden (Hackett et al., 1986; Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1992).

Bei Tumorzellen oder von Viren infizierten Zellen kommt es zu einer verminderten Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche (Garrido, 1996; Garrido et al., 1997; Ploegh, 1998). Hierdurch können diese Zellen einer Entdeckung und Lyse durch zytotoxische T-Zellen entkommen. NK-Zellen allerdings, die transformierte oder durch Viren infizierte Zielzellen gerade durch das Fehlen der MHC-I-Moleküle erkennen können (Trincheri, 1990; Biron, 1997), eliminieren diese für zytotoxische T-Zellen "unsichtbaren" Zellen.

Bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) werden virusinfizierte Zielzellen von NK-Zellen getötet. Die virusinfizierten Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche virale Proteine, die von Antikörpern erkannt werden. Die NK-Zellen binden über ihren Fc-Rezeptor (Fc $\gamma$ RIII; CD16) die Antikörper und es kommt zur Ausschüttung von cytoplasmatischen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten.

### 1.2.2 Zytotoxische T-Lymphozyten

T-Zellen erkennen ihre Zielzellen über eine Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem Komplex aus MHC-Molekül und daran gebundenem Peptid auf der Membran der Zielzelle. Aufgrund des Vorhandenseins zweier unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, den Korezeptoren CD4 oder CD8, bindet die T-Zelle entweder

an MHC-Klasse-II- oder MHC-Klasse-I-Moleküle. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als Helferzellen bezeichnet und produzieren als Th1- und Th2-Zellen vor allem Zytokine. CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, weil sie virusinfizierte Zielzellen töten. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren dabei Peptide von extrazellulären Antigenen, während MHC-Klasse-I-Moleküle Peptide intrazellulärer Antigene präsentieren. Virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen werden auf diese Weise von CD8<sup>+</sup> T-Zellen über ihre MHC-Klasse-I-Moleküle erkannt und eliminiert. Gelingt es diesen Zellen allerdings, die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle zu unterdrücken, können sie auf diese Weise der Zerstörung durch die zytotoxischen T-Zellen entgehen.

### 1.3 Rezeptoren auf NK-Zellen

Aufgrund der Beobachtung, dass die Zellen, die nicht von NK-Zellen getötet wurden, eine normale Expression von "selbst" MHC-Molekülen auf der Oberfläche aufwiesen, während die Zielzellen, die getötet wurden, eine veränderte Expression dieser Moleküle aufwiesen, vermuteten Ljunggren und Kärre (1990), dass das Vorhandensein von "selbst" MHC-Molekülen die Zellen vor einer Eliminierung durch NK-Zellen schützt. Diese Beobachtung wurde als "missing self" Hypothese bezeichnet und besagt, dass eine Zielzelle nur dann von NK-Zellen getötet wird, wenn sie kein "selbst" MHC-Molekül auf ihrer Oberfläche exprimiert. Die Erkennung der Zielzellen wird durch Rezeptoren ermöglicht, die an MHC-Moleküle binden und somit die NK-Zelle inhibieren (Moretta 1990 und 1993). Diese inhibitorischen Rezeptoren sind zwei Rezeptor-Familien zuzuordnen; der Immunoglobulin-Familie (immunoglobulin superfamily Ig-SF) und der Lektin-Familie (C type lectin superfamily) (Moretta et al., 1996 und 1997; Lanier 1998; Long 1999; Lopez-Botet et al., 1997). Zur Immunoglobulin-Familie gehören die Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (Killer Ig-like receptors, KIR), die verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen können (Moretta et al., 1996; Lanier, 1998; Vilches und Parham, 2002). Die KIR-Gene befinden sich zusammen mit den Genen für ILT (Ig-like transcripts) oder LIR (leukocyte Ig-like receptors) auf dem Chromosom 19, im sogenannten Leukozyten-Rezeptor-Komplex (leukocyte receptor complex, LRC) (Wende et al., 1999). Während die ILT/LIR hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen,

Dendritischen Zellen und B-Zellen und nur wenige auf NK- und T-Zellen exprimiert werden (Borges et al., 1997; Colonna et al., 1999, Young et al., 2001), sind KIR auf fast allen NK-Zellen und auf Subpopulationen von T-Zellen exprimiert (Falk et al., 1995; Mingari et al., 1997). Die KIR-Moleküle sind Transmembran-Glycoproteine, die sich in der Anzahl der Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) in der extrazellulären Region unterscheiden. Entweder sind zwei Ig-Domänen vorhanden (p50 und p58), diese KIR interagieren mit HLA-C-Liganden (Colonna et al., 1993; Moretta et al., 1995) oder es sind drei Ig-Domänen vorhanden (p70, p70 $\Delta$ , p140), wobei diese KIR HLA-B oder HLA-A-Moleküle erkennen (Döhning et al., 1996; Litwin et al., 1994; Pende et al., 1996). Je nach Länge der zytoplasmatischen Domäne, die lang (long; L) oder kurz (short; S) sein kann, werden die KIR als KIR2DL oder KIR3DL und KIR2DS oder KIR3DS bezeichnet. Die langen zytoplasmatischen Domänen enthalten zwei ITIM (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif, Daeron und Vivier, 1999), die für die inhibitorische Funktion dieser KIR verantwortlich sind, während die kurzen zytoplasmatischen Domänen keine ITIM, dafür aber positiv geladene Aminosäuren in der Transmembrandomäne besitzen, die eine Interaktion mit DAP12 ermöglichen (Olcese, 1997; Lanier, 1998). Auf diese Weise erfolgt eine Aktivierung über ein ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activating motif), das im zytoplasmatischen Teil dieses Adaptor-Moleküls enthalten ist.

Die Rezeptoren der Lektin-Familie sind auf Chromosom 12 codiert, in einem Bereich, der NK-Genkomplex genannt wird (Barten et al., 2001). Hierbei handelt es sich um die NKG2-Familie, wobei hauptsächlich NKG2A, das mit CD94 ein Heteromer bildet, als inhibitorischer Rezeptor eine Rolle spielt (Carretero et al., 1997; Lazetic et al., 1996; Brooks et al., 1997; Houchins et al., 1997). CD94/NKG2A erkennt HLA-B-Moleküle (Moretta et al., 1994), einige HLA-C- und HLA-A-Moleküle (Sivori 1996) und HLA-E-Moleküle (Braud et al., 1997 und Lee, 1998). Wie bei den KIR sind auch bei NKG2A ITIM im zytoplasmatischen Teil vorhanden, während diese Motive bei CD94 fehlen. Die aktivatorischen Rezeptoren der Lektin-Familie sind CD94/NKG2C und CD94/NKG2E (Houchins et al., 1991; Chang et al., 1995). NKG2C und NKG2E enthalten im Gegensatz zu NKG2A keine ITIM, sondern wie die stimulatorischen KIR geladene Aminosäuren, über die eine Interaktion mit dem Adaptormolekül DAP12 ermöglicht wird (Lanier et al., 1998). NKG2D gehört ebenfalls zur Lektin-Familie (Wu et al., 1999; Bauer et al., 1999), assoziiert aber nicht mit CD94, sondern wird als Homodimer exprimiert. Es interagiert mit DAP10 oder mit KAP10 (Chang et al.,

---

1999), das durch ITAM eine Aktivierung bewirkt. NKG2D bindet an MICA und MICB (Groh et al., 1996 und 1999; Bauer et al., 1999), die im MHC-Komplex codiert sind und durch Stress induziert werden. Außerdem sind ULBP (UL16-bindende Proteine) NKG2D-Liganden (Cosman et al., 2001).

Weitere aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen sind die NCR (natural cytotoxicity receptors) NKp46, NKp30 und NKp44 (Moretta et al., 2001), die von allen NK-Zell-Markern am besten für eine Abgrenzung gegenüber anderen Zelltypen geeignet sind. NKp46 und NKp30 sind auf ruhenden oder aktivierten NK-Zellen zu finden, während NKp44 nur von aktivierten NK-Zellen exprimiert wird (Vitale et al., 1998). Die NCR sind Ig-ähnliche Transmembran-Glycoproteine, die keine ITAM besitzen (Pessino 1998; Pende, 1999; Cantoni, 1999), sondern mit Molekülen interagieren, die ITAM enthalten. Dies sind für NKp46 und NKp30 CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  und für NKp44 DAP12 (Moretta 2000 und 2001). Korezeptoren für die Aktivierung durch NCR sind 2B4 (CD244) (Sivori 2000) und NTB-A (Bottino 2001 und Falco et al., 2004), die zur CD2-Familie gehören sowie NKp80 (Vitale, 2001). 2B4 ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das sowohl von unstimulierten als auch von stimulierten NK-Zellen exprimiert wird und auch auf der Oberfläche von Monozyten, Basophilen und auf einigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu finden ist (Nakajima et al., 1999). Sein Ligand, CD48 wird von T-, B-, NK-Zellen, Monozyten und Endothelzellen exprimiert (Brown et al., 1998; Kubin et al., 1999). NKp80 ist ein Typ-II-Transmembranprotein und wird ebenfalls von allen NK-Zellen exprimiert aber nur von wenigen CD56<sup>+</sup> T-Zellen (Vitale et al., 2001).

Humane sowie murine periphere NK-Zellen exprimieren CD161 (Loza et al., 2002) und CD56 (Lanier et al., 1989), wobei die Funktion von CD56 in NK-Zellen nicht geklärt ist.

| <b>Rezeptor</b>  | <b>Ligand</b>   | <b>Struktur</b>            | <b>Funktion</b> |
|------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| KIR2DS1          | HLA-C Gruppe 2  | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| KIR2DS2          | HLA-C Gruppe 1  | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| KIR2DL4          | HLA-G           | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| KIR2DS4          | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| KIR2DS5          | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| KIR3DS1          | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| NKG-2D           | MICA/MICB       | C-Typ lektinartig          | aktivierend     |
| NKG2C - CD94     | HLA-E           | C-Typ lektinartig          | aktivierend     |
| NKG2E/H          | unbekannt       | C-Typ lektinartig          | aktivierend     |
| NKp46/CD335/NCR1 | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| NKp44/CD336/NCR2 | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| NKp30/CD337/NCR3 | unbekannt       | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| CD16             | Fc-Teil des IgG | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| CD2              | CD58            | immunoglobulinartig        | aktivierend     |
| LFA-1            | ICAM-1          | Integrin                   | aktivierend     |
| 2B4              | CD48            | Typ-I-Transmembranprotein  | aktivierend     |
| NKp80            | unbekannt       | Typ-II-Transmembranprotein | aktivierend     |
| CD69             | unbekannt       | C-Typ lektinartig          | aktivierend     |
| CD40-Ligand      | CD40            | TNF-ähnlich                | aktivierend     |
| KIR2DL1          | HLA-C Gruppe 2  | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR2DL2          | HLA-C Gruppe 1  | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR2DL3          | HLA-C Gruppe 1  | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR2DL5          | unbekannt       | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR3DL1          | HLA-Bw4         | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR3DL2          | HLA-A3-11       | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| KIR3DL3          | unbekannt       | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| NKG2A/A - CD94   | HLA-E           | C-Typ lektinartig          | inhibierend     |
| ILT-2 - LIR-1    | unbekannt       | immunoglobulinartig        | inhibierend     |
| P75/AIRM         | unbekannt       |                            | inhibierend     |
| IRp60            | unbekannt       |                            | inhibierend     |
| LAIR-1           | Ep-CAM          |                            | inhibierend     |

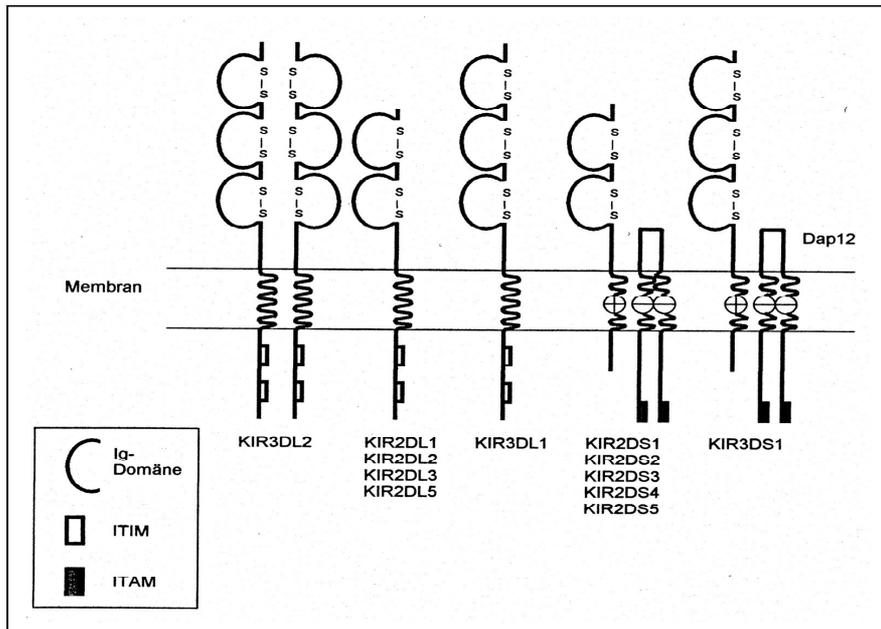


Abb. 1.1: NK-Zell-Rezeptoren der Immunoglobulin-Familie.

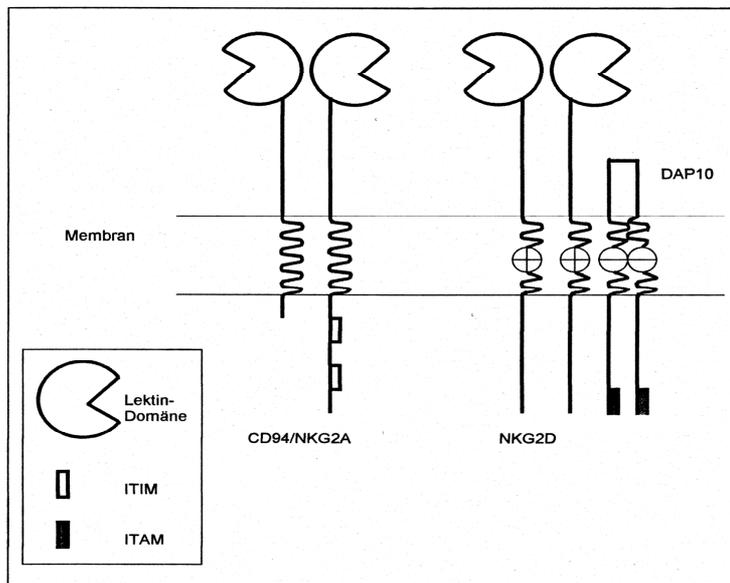


Abb. 1.2: NK-Zell-Rezeptoren der Lektin-Familie.

## 1.4 Steuerung der NK-Zellaktivität durch aktivierende und inhibierende Rezeptoren

Die Reaktion der NK-Zelle gegenüber einer Zielzelle wird sowohl durch aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren auf der NK-Zelle gesteuert. Zu einer Lyse der Zielzelle kommt es dabei nur, wenn die aktivierenden Signale, die die NK-Zelle über ihre Rezeptoren erhält, überwiegen. Werden nur inhibierende Signale geliefert, oder überwiegen die inhibierenden die aktivierenden Signale, wird die Zielzelle verschont. Hat die Zielzelle keine körpereigenen MHC-I-Moleküle, erhält die NK-Zelle keine Signale über die inhibierenden Rezeptoren und es kommt zur Lyse der Zielzelle.

Von Influenzaviren wurde allerdings kürzlich bekannt, dass sie sich durch eine Neuverteilung ihrer MHC-I-Proteine auf der Oberfläche dem Angriff durch NK-Zellen entziehen, wobei die Bindung der inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren kurz nach der Influenza-Infektion stattfindet, noch bevor der aktivierende Rezeptor NKp46 binden kann (Achdout et al., 2008).

## 1.5 NK-Rezeptoren auf T-Zellen

Subpopulationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren die meisten der Rezeptoren, die auf NK-Zellen exprimiert werden (NKR) ebenfalls. So wird KIR und CD94/NKG2 auch auf Subpopulationen von  $\alpha\beta$ T-Zellen (Ferrini et al, 1994; Mingari et al., 1995; Phillips et al., 1995) und von  $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert (Nakajima et al., 1995; Battistini et al., 1997), wobei das KIR-Repertoire der  $\alpha\beta$ T-Zellen vom Repertoire der  $\gamma\delta$ T-Zellen und der NK-Zellen desselben Spenders abweichen kann (Uhrberg et al., 2001).

2B4 wird auf aktivierten und Memory-T-Zellen exprimiert, wobei Kambayashi et al. (2001) eine Regulation der Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch 2B4 zeigen konnten.

T-Zellen, die NK-Zell-Rezeptoren aufweisen, besitzen kein CD28 und CD45RA, exprimieren dafür aber CD45RO, sowie CD18, CD44, CD29 und CD57, was sie als Memory-T-Zellen ausweist, die bereits durch Antigene stimuliert wurden (Mingari et al., 1996; De Maria et al., 1997; Bakker et al., 1998; Speiser et al., 1999). Andere Moleküle, wie CD56 können ebenfalls auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden (Pittet et al., 2000), während die NCR ausschließlich auf NK-Zellen zu finden sind.

## 1.6 Effektormechanismen

NK-Zellen sowie zytotoxische T-Lymphozyten eliminieren ihre Zielzellen durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen.

Bei der antikörpervermittelten Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) reagieren die Antikörper, die an eine Zielzelle gebunden sind mit dem Fc-Rezeptor auf der NK-Zelle FcγRIII (CD16), wodurch aus den zytoplasmatischen Granula Perforin und Granzyme freigesetzt werden. Durch diese zytotoxischen Proteine kommt es zu einer Zerstörung der Zelle. Perforin bildet dabei Poren in der Membran, durch die Wasser und Salze in die Zielzelle gelangen können. Granzyme aktivieren dagegen eine Enzymkaskade, die zur Apoptose der Zielzelle führt. Von Granzym M ist dabei bekannt, dass es wichtige Komponenten des Zytoskeletts angreift, was zum Absterben der Zellen beiträgt (Bovenschen et al., 2008).

Über die Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie wird ebenfalls eine Apoptose ausgelöst. CD95/Fas, TNF-R und TRAIL-R besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne, die durch Bindung der Rezeptoren an ihre Liganden (CD95L/FasL, TNF, TRAIL) aktiviert wird und zur Bildung des DISC (death inducing signalling complex) führt (Sartorius et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung einer Protease/Caspase-Kaskade und zum Tod der Zielzelle (Salvesen et al., 1997).

Die Effektorfunktionen von NK-Zellen werden durch Zytokine wie Interferon (IFN) reguliert (Reiter, 1993). IL-2, das von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert wird, steigert die Produktion von Perforin und Granzymen in NK-Zellen (Salcedo et al., 1993). Interferon alpha (IFN-α), IL-12 und IL-18, die von aktivierten Makrophagen sezerniert werden, steigern ebenfalls die NK-Zell-Zytotoxizität, wobei von den NK-Zellen Interferon gamma (IFN-γ) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) produziert wird (Gately, 1998; Matikainen et al., 2001). Durch Monocyten, die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind, werden NK-Zellen zur Produktion von IFN-γ, TNF-α und Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Factor (GM-CSF) angeregt (Scott und Trinchieri, 1995).

Durch IL-21 in Kombination mit IL-2 ändert sich das Expressionsmuster von NK-Zellen, wobei die Expression von NKG2D reduziert und die Expression von NKp30 und 2B4 induziert wird (Burgess et al., 2006). Perez et al. (2006) zeigten, dass IL-21 in Gegenwart von physiologischen Konzentrationen an Hydrocortison die Funktionen von aus Nabelschnurblut kultivierten NK-Zellen beeinflusst. Es wurden Änderungen in der Sekretion von Zytokinen beobachtet, wie ein Anstieg von IL-10 und Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Factor (GM-CSF), während die Expression von TNF- $\alpha$  reduziert wurde.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die an der Regulation der Expression von Rezeptoren in Natürlichen Killerzellen beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen verglichen, der Zellpopulation, der sie in ihren Funktionen am ähnlichsten sind. Zur Abtötung ihrer Zielzellen verwenden beide dieselben Mechanismen, bedienen sich aber in der Erkennung dieser Zielzellen jeweils anderer Rezeptoren. Da sich NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen also vor allem durch ihre Oberflächenmoleküle unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Genexpression beider Zellpopulationen unterschiedlich reguliert wird. Demzufolge müssten je nach Zelltyp verschiedene Faktoren vorhanden sein oder unterschiedlich stark exprimiert werden.

Die bisherigen Vergleiche von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Literatur beruhen auf Methoden wie SAGE oder Mikroarray (Obata-Onai et al., 2002; Hashimoto et al., 2003). Beide Methoden haben den Vorteil, dass eine Quantifizierung der Transkripte möglich ist. Allerdings ist es nicht möglich, mit diesen Methoden unbekannte Transkripte zu erfassen, da nur nach bereits bekannten Sequenzen gesucht werden kann.

In dieser Arbeit wurde deshalb eine andere Methode angewandt, mithilfe derer einerseits auch unbekannte Sequenzen erfasst werden und andererseits seltene Transkripte angereichert werden, damit diese nicht vor dem Hintergrund der häufig vorkommenden Transkripte vernachlässigt werden. Diese Methode beruht auf der Subtraktion der cDNA der zu vergleichenden Zellpopulationen (PCR-Select cDNA-Subtraktion, Diatchenko et al., 1998). Nach einer Hybridisierung der cDNA erfolgt eine Amplifikation durch PCR, eine Klonierung und schließlich die Sequenzierung der erhaltenen Fragmente. Die Expression der auf diese Weise für verschiedene Zellpopulationen erhaltenen differentiell exprimierten Sequenzen sollte mithilfe der Real-time PCR quantifiziert werden.

Als Zellmaterial wurden sowohl NK- und T-Zelllinien verwendet als auch primäre NK-Zellen aus Nabelschnurblut sowie peripherem Blut.

Weiterhin sollten die Expressionsprofile kultivierter NK-Zellen ebenfalls mithilfe der PCR-Select-Methode untersucht werden. Hierbei wurden die NK-Zellen mit Interleukin-15 (IL-15) sowie Interleukin-21 (IL-21) kultiviert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Laborgeräte

AbiPrism™ 3700 Sequencer, Applied Biosystems, CA, USA

Biomek® Pipettierautomat (dotblots), Beckmann Coulter, Krefeld

Brutschrank Bakterien, WTC Binder, Tuttlingen

Brutschrank für Minipreps, GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Cell-Dyn®, Abbott Laboratories, IL, USA

Eismaschine, F90 Compact Electronic, Icematic

Elektroporator EysyjectT, Peqlab

Elektroporationsküvetten, Peqlab

Finnpipetten, Labsystems, Helsinki, Finnland

Gelkammer, GNA 200, Pharmacia Biotech, Wien, Österreich

Gelkammer für SDS-PAGE

GeneScreen Plus, Hybridization Transfer Membrane, PerkinElmer, Boston, USA

Gelfotosystem, Kamera E.A.S.Y. 429 K, Herolab, Wiesloch

Gelfotosystem, Verstärker P91, Mitsubishi, Japan

Gelfotosystem, Fotopapier K 65HM-CF/KP 65HM-CE, Mitsubishi, Japan

Heizblock, HBT 130, HLC, Haep Labor Consult, Bovenden

Heizblock, neo Block II, neoLab, Heidelberg

Heizblock, Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg

Inkubator, CERTOMAT® H, Braun Biotech International, Sartorius AG, Göttingen

MACS, midi Magnet, Miltenyi, Bergisch Gladbach

MACS, mini Magnet, Miltenyi, Bergisch Gladbach

MACS, Halterung für Magnete, Miltenyi, Bergisch Gladbach

Magnetrührer, MR3001, Heidolph Instruments, Schwabach

Mikrowellengerät, Micro-Chef FM 2515, Moulinex, Frankreich

Multipipette, Distriman®, Gilson International, Bad Camberg

Multipipette, Eppendorf, Hamburg

Neubauer Zählkammer, Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen

Nucleofector™, Amaxa Biosystems  
PCR-Maschine, GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, CA, USA  
PCR-Maschine, GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, CA, USA  
pH-Meter, HI 9321 Microprozessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein  
Photometer, Gene Quant *pro* RNA/DNA Calculator, Pharmacia, Freiburg  
Pipetboy acu, Integra Biosciences, Chur, Schweiz  
Powersupply, Power Pac 300, BioRad, CA, USA  
Schüttler CERTOMAT® MO, Braun Biotech International, Sartorius AG, Göttingen  
Semi-Dry, Blotting-Kammer, BioRad, CA, USA  
Sterilbank, Jouan, Dreieich  
Sterilbank, Gelaire® BSB 3A  
TaqMan™, ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, CA, USA  
UV Stratalinker® 1800, Stratagene, CA, USA  
Vortexer, REAX top, Heidolph Instruments, Schwabach  
Waage, Kern 440-47, Balingen  
Waage, Kern GS, Balingen  
Wasserbad, GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
Zentrifuge, Hettich Rotina 46R, Hettich, Bäch, Schweiz  
Zentrifuge, Hettich Universal 30 RF, Hettich, Bäch, Schweiz  
Zentrifuge, MICRO 20, Hettich, Bäch, Schweiz  
Zentrifuge, SIGMA 2 K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode  
Zellkulturbrutschrank, IG 150, Jouan, Dreieich  
Zellkulturbrutschrank, CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Forma Scientific  
Zellkultur Mikroskop, Wilovert S, Hund, Wetzlar

### **3.1.2 Verbrauchsmaterialien**

10 µl SafeSeal-Tips® Biozym, Hess. Oldendorf  
200 µl SafeSeal-Tips® Biozym, Hess. Oldendorf  
1000 µl SafeSeal-Tips® Biozym, Hess. Oldendorf  
8er Cap Strips, Biozym, Hess. Oldendorf  
Alufolie, Roth, Karlsruhe  
CELLSTAR® 15 ml Reaktionsgefäße, Greiner, Frickenhausen  
Cell Strainer, Zellsieb, 40 µm, Nylon, Becton Dickinson, NJ, USA

Combitips 1,25 ml, Eppendorf, Hamburg  
Combitips 5 ml, Eppendorf, Hamburg  
Deckel für PCR-Platten TaqMan™, Ultra Clear Cap Strips, AB-0866, ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien  
Eco-line Präzisionsspitzen, 100 – 1000 µl, Welabo, Düsseldorf  
FALCON® 50 ml Reaktionsgefäße, Becton Dickinson, NJ, USA  
FALCON® Facs-Röhrchen, 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, NJ, USA  
FALCON® 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube Caps, Becton Dickinson, NJ, USA  
Frischhaltefolie, Saran, Dow Chemical Company, MI, USA  
Klebefolie Scotch® 3M, Neuss  
MACS Separation Columns LS, Miltenyi, Bergisch Gladbach  
MACS Separation Columns MS, Miltenyi, Bergisch Gladbach  
MicroAmp® Caps, Applied Biosystems, CA, USA  
MicroAmp®, Optical 96-Well Reaction Plates, Applied Biosystems, CA, USA  
Minisart Spitzenfilter 0,45 µm, Sartorius, Göttingen  
Minisart Spitzenfilter 0,20 µm, Sartorius, Göttingen  
Multi-Screen®-HV, Clear Plates, Millipore Corporation, MA, USA  
Original-Perfusor®-Spritze OPS 50 ml, Braun, Melsungen  
Parafilm, Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA  
PCR<sub>96</sub> Cleanup Plates, Millipore, MA, USA  
PCR-Platten für Sequenzierung, MicroAmp, Optical 96-Well Reaction Plates, Part Number N801-0560, Applied Biosystems, CA, USA  
PCR-Platten TaqMan™, Thermo-Fast®96 Detection Plates, AB-1100, ABgene, Epsom, Surrey, UK  
PCR-Platten, Cellstar® TC-Plate 96 Well Microtiterplatten, Greiner, Frickenhausen  
Polylab Ökobox, 0,5 – 10 µl, Welabo, Düsseldorf  
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg  
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg  
Safe-Lock Tubes 2 ml, Eppendorf, Hamburg  
Sterican Einmal-Kanülen, 0,90 x 70 mm, Braun, Melsungen

Strip-Ease-8, 0,2 ml PCR-Tubes, Robbins Scientific Corporation, CA, USA

Strip-Ease-8 PCR Tube Caps, Robbins Scientific Corporation, CA, USA

Stripette® Einwegpipette, 5, 10, 25 ml, Corning, NY, USA

Thermowell 96 Well Plate, Corning, NY, USA

Thermo-Fast®96 Semi-Skirted, ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien

Thermo-Fast®96 Detection Plates, ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien

Transfer-Pipetten, Pasteurpipetten, 3,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht

TubePlates mit 96 Soft Tubes, Biozym, Hess. Oldendorf

Ultra Clear Cap Strips, ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien

### 3.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung, Roth, Karlsruhe

Ammoniumchlorid-Lösung, Universitätsklinikum Düsseldorf Apotheke, Düsseldorf

Ammoniumperoxodisulfat, Roth, Karlsruhe

Aqua ad injektabilia Delta-Select, Delta-Select, Pfullingen

Biocoll Separating Solution, Biochrom, Berlin

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt

Caesiumchlorid, Merck, Darmstadt

Coomassie, Merck, Darmstadt

Chloroform, Roth, Karlsruhe

DEPC, Roth, Karlsruhe

DMSO: Dimethylsulphoxid, Sigma, Steinheim

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III), Roth, Karlsruhe

Essigsäure, Roth, Karlsruhe

Ethanol, Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Merck, Darmstadt

Formaldehyd, Merck, Darmstadt

Glycerin, Roth, Karlsruhe

Glycin, Roth, Karlsruhe

Glycogen, Boehringer, Mannheim

Guanidiniumisothiocyanat, Sigma, Steinheim

HEPES, Sigma, Steinheim

Isopropanol, Roth, Karlsruhe

LiChrosolv<sup>®</sup> H<sub>2</sub>O, Merck, Darmstadt  
 Mercapthoethanol, Roth, Karlsruhe  
 Methanol, Roth, Karlsruhe  
 Mineralöl, Sigma, Steinheim  
 MOPS, Roth, Karlsruhe  
 N-Laurylsarcosin, Sigma, Steinheim  
 Natriumacetat, Merck, Darmstadt  
 Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe  
 Natriumcitrat, Roth, Karlsruhe  
 Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt  
 Natriumhydroxyd, Merck, Darmstadt  
 PBS, Serag-Wiessner, Naila  
 TRIS-hydrochlorid, Roth, Karlsruhe  
 TRIS Pufferan, Roth, Karlsruhe  
 Trypanblau, Merck, Darmstadt

### 3.1.4 Zelllinien

KG1 humane akute myeloische Leukämie-Zelllinie (Koeffler et al., 1978)  
 Jurkat CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie (Gillis, 1980)  
 NKL IL-2 abhängige NK-Zelllinie (Robertson, 1996)  
 NK3.3 IL-2 abhängige NK-Zelllinie (Kornbluth, 1985)

### 3.1.5 Medien für die Zellkultur

RPMI 1640 25 mM Hepes, L-Glutamin, BioWhitaker  
 RPMI 10 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin in RPMI 1640  
 NKL-Medium 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 200 U/ml IL-2 in RPMI 16  
 NK3.3-Medium 10 % "Killer Cult" (Kulturüberstand von PMNC, die 48 h mit PHA-M und JY stimuliert wurden), 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin in RPMI 1640  
 NK-Medium 10 % FCS, 5 % humanes Serum (hitzeinaktiviert), 1 % Penicillin-Streptomycin, 1000 U/ml IL-2 in RPMI 1640

### 3.1. 6 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Ammoniumchloridlösung      8,3 g NH<sub>4</sub>Cl  
   1 g KHCO<sub>3</sub>  
   0,0375 g EDTA-Na<sub>2</sub>  
   in 1000 ml H<sub>2</sub>O

### 3.1.7 Reagenzien für die Zellkultur

AZA (5-Aza-2'-deoxycytidin), Sigma  
FCS, Biochrom  
Penicillin-Streptomycin, Gibco  
Geneticin, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland  
TSA (Trichostatin A), Sigma

### 3.1.8 Zytokine

IL-2, Chiron, Ratingen  
IL-15, PeproTech, NJ, USA  
IL-21, Zymogenetics, Seattle, USA

### 3.1.9 Antikörper für Zellisolierung und FACS-Analyse

CD56-PE, Immunotech, Marseille  
CD8-FITC, Immunotech, Marseille  
CD3-PC5, Immunotech, Marseille  
CD4-PE, Beckmann Coulter, Krefeld  
CD19-PE, Beckmann Coulter, Krefeld  
Anti-PE-beads, Beckmann Coulter, Krefeld

### 3.1.10 Antikörpergekoppelte Microbeads für Magnetische Zellseparation

CD8 MultiSort Kit, Miltenyi, Bergisch Gladbach

Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, , Miltenyi, Bergisch Gladbach

CD56 MultiSort Kit, Miltenyi, Bergisch Gladbach

CD3 MicroBeads, Miltenyi, Bergisch Gladbach

NK Cell Isolation Kit, Miltenyi, Bergisch Gladbach

### 3.1.11 Antikörper für Western Blot

Mouse anti-human PLZF, Calbiochem

Goat anti-mouse, Serotech

### 3.1.12 Antikörper für Chromatin-Immunopräzipitation

Mouse anti-human PLZF, Calbiochem

Anti-rabbit IgG, Upstate (# 07-028)

Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8), Upstate (# 07-328)

Anti-dimethyl-Histone H3 (K9), Upstate (# 07-441)

### 3.1.13 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

|            |  |
|------------|--|
| LB-Medium  | 20 g LB Broth Base<br>in 1000 ml H <sub>2</sub> O                        |
| LB-Agar    | 6 g Select Agar<br>10 g LB Broth Base<br>in 500 ml H <sub>2</sub> O      |
| TE-Puffer  | 10 mM Tris-HCl<br>1 mM EDTA<br>pH 7,4                                    |
| TBE-Puffer | 107,8 Tris-Base<br>55 g Borsäure<br>8,2 g EDTA, in 10 l H <sub>2</sub> O |

GIT-Lösung:

94,53 g Guanidiniumisothiocyanat (4M)  
1,67 ml 3 M Natriumacetat, pH 6  
0,5 % w/v N-Laurylsarcosin  
0,1 M Mercaptoethanol  
mit DEPC- H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen

CsCl-Lösung:

95,97 g CsCl (5,7 M)  
0,83 ml 3 M Natriumacetat, pH 6  
mit DEPC- H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

Differential-Screening:

Denaturierungslösung für die Nested-PCR-Produkte:

0,6 M NaOH

Neutralisierungslösung für die Nested-PCR-Produkte:

0,5 M Tris-HCl pH 7,5

Hybridisierungslösung:

1 M NaOH

0,5 M Tris-HCl pH 7,5

10 % SDS

20x SSC (175 g NaCl

88,2 g Na<sub>3</sub> Citrat in 1l

H<sub>2</sub>O)

Aus der Hybridisierungslösung wurde die Waschlösung hergestellt:

Waschlösung 1: 2x SSC, 0,5 % SDS

Waschlösung 2: 0,2x SSC, 0,5 % SDS

### 3.1.14 Puffer und Lösungen für die Proteinchemie

1 M Tris-HCl pH 8,8

1 M Tris-HCl pH6,8

10 x Elektrodenpuffer:

144 g Glycin

30 g Tris Base

10 g SDS

in 1 l H<sub>2</sub>O (pH 8,9)

Färbelösungen für SDS-Gele:

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| Lösung 1: | 25 % Isopropanol         |
|           | 10 % Essigsäure          |
|           | 30 mg/l Coomassie (G250) |
| Lösung 2: | 10 % Isopropanol         |
|           | 10 % Essigsäure          |
|           | 30 mg/l Coomassie (G250) |
| Lösung 3: | 10 % Essigsäure          |
|           | 30 mg/l Coomassie (G250) |

Western-Blott-Puffer:

|       |                         |
|-------|-------------------------|
| (10x) | 250 mM Tris             |
|       | 1,92 M Glycin           |
|       | pH 8,3                  |
| (1x)  | 100 ml 10xWB-Puffer     |
|       | 200 ml Methanol         |
|       | 700 ml H <sub>2</sub> O |

Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, BioRad, CA, USA

5x Auftragspuffer, reduzierend, BioRad, CA, USA

### 3.1.15 Reaktions-„Kits“

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, CA, USA

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit mit Protein A

agarose/Salmonsperm DNA, Upstate, USA

DC Protein Assay, Bio-Rad, CA, USA

ECL™ Western Blotting Detection Reagents, Amersham, Freiburg

iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, CA, USA

Oligotex™ mRNA Isolation Kit, Qiagen, Hilden

PCR-Select™, Clontech, USA

PCR-Select™ Differential Screening Kit, Clontech, USA

QIAprep® Spin, Qiagen, Hilden

QIAquick<sup>®</sup> PCR purification Kit, Qiagen, Hilden

QIAquick<sup>®</sup> PCR Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden

RNeasy<sup>®</sup> Micro und Mini, mit RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden

SMART<sup>™</sup> cDNA Amplification Kit, Clontech, USA

TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen, CA, USA

### **3.1.16 Klonierung und Transformation**

IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalctopyranosid), Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Ampicillin, Sigma, Steinheim

Kanamycin A, Sigma, Steinheim

Neomycin, Sigma, Steinheim

LB, Lennox L Broth Base, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, Scotland

Select Agar, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

### **3.1.17 Vektoren**

pcDNA/PLZF(2,1), Vektor pcDNA3.1(+) mit der kodierenden Region des humanen PLZF mit 65 bp 5'-UTR und 34 bp 3'-UTR, kloniert in die HindIII/BamHI Stellen, Dr. Birgit Gellersen, Endokrinologikum Hamburg

Vektor pCR<sup>®</sup>2.1, supercoiled, 10ng/ $\mu$ l in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8

### **3.1.18 Restriktionsenzyme**

*Bam*HI, Gibco BRL (mit React 3, Puffer, Gibco BRL)

*Eco*RI, Gibco BRL (mit React 3, Puffer, Gibco BRL)

*Hind*III, Gibco BRL (mit React 3, Puffer, Gibco BRL)

*Rsa* I, Gibco BRL (mit React 1, Puffer, Gibco BRL)

### **3.1.19 PCR**

Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase-Mix, Clontech, CA, USA

dNTP's, Peqlab, Erlangen

Taq-Polymerase, Peqlab, Erlangen

Taq-Polymerase, Qiagen, Hilden

Hotstar Taq<sup>™</sup>-Polymerase, Qiagen, Hilden

### **3.1.20 cDNA-Synthese**

Superscript<sup>™</sup> II MMLV RNase H<sup>-</sup> Punktmutation Rev. Transkriptase, Invitrogen, USA

5 x First-Strand Buffer, Invitrogen, USA

0,1 M DTT Invitrogen, USA

### **3.1.21 DNA Gelelektrophorese**

DNA-Leiter 25 bp DNA Ladder, GibcoBRL, Life Technologies Inc., MD, USA

DNA-Leiter 1 kb DNA Ladder, GibcoBRL, Life Technologies Inc., MD, USA

DNA-Leiter 100 bp DNA Ladder, GibcoBRL, Life Technologies Inc., MD, USA

### **3.1.22 Quantitative PCR/Real-time PCR**

QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Qiagen, Hilden

### **3.1.23 Radioaktiv markierte Sonden**

[alpha-P<sub>32</sub>]dCTP, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

### 3.1.24 Oligonukleotide:

Die Primer wurden mit den Programmen „Primer3“ ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)), „Primer Express™“ (Applied Biosystems) und „Oligo“ entworfen. Die Primer für die SMART™ und PCR-Select™ -Methode wurden den Reaktionskits entnommen.

Primer für SMART™ und PCR-Select™ -Methode:

(*Rsa* I site ist unterstrichen)

SMART II Oligo: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'

CDS-Primer: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>N<sub>-1</sub>N-3'

N = A, C, G oder T; N<sub>-1</sub> = A, G oder C

PCR-Primer: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'

G3PDH-5': 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH-3': 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Nested Primer 1: 5'-TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT-3'

Nested Primer 2R: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

KIR-Primer:

KIR2DL3-5': 5'-CCTTCATCGCTGGTGCTG

KIR2DL3-3': 3'-CAGGAGACAACCTTTGGATCA

Tab. 3.1: Primer.

| Name               | Sequenz                | Produktgr. | Annealingtemp. |
|--------------------|------------------------|------------|----------------|
| BBX-3'             | gcaccttgcaagacctc      | 303 bp     | 57 °C          |
| BBX-5'             | caaggaagcattttggatg    | 303 bp     | 57 °C          |
| BHLHB2-3'          | gggataccagcacttctcca   | 209 bp     | 57 °C          |
| BHLHB2-5'          | gcgcaattaagcaagagtcc   | 209 bp     | 57 °C          |
| CDKN1A-3'          | tgccctcgagaggtttacag   | 222 bp     | 57 °C          |
| CDKN1A-5'          | tatggggctgggagtagttg   | 222 bp     | 57 °C          |
| c-myc-3'           | cgttccgcaacaagtcctct   | 102 bp     | 55 °C          |
| c-myc-5'           | ggccccaaggtagttatcctt  | 102 bp     | 55 °C          |
| Cyclin A2-3'       | gcactgacatggaagacaggaa | 107 bp     | 55 °C          |
| Cyclin A2-3' (DNA) | cacctagtgagcaggctgt    | 162 bp     | 60 °C          |
| Cyclin A2-5'       | tctcgtggactggttagttga  | 107 bp     | 55 °C          |
| Cyclin A2-5' (DNA) | aacgtgccccagattttaga   | 162 bp     | 60 °C          |
| EEF1A1-3'          | tgcaggaacatgtcaaca     | 234 bp     | 57 °C          |

|                          |                        |        |       |
|--------------------------|------------------------|--------|-------|
| EEF1A1-5'                | aaaatgaccacccaatggaa   | 234 bp | 57 °C |
| EEF1B2-3'                | tgcccaaagctttctcact    | 184 bp | 57 °C |
| EEF1B2-5'                | gattacctggcggacaagag   | 184 bp | 57 °C |
| EEF1G-3'                 | ggctgctggatgcttacttg   | 150 bp | 57 °C |
| EEF1G-5'                 | gcggttggtattgggaaagg   | 150 bp | 57 °C |
| EEF2-3'                  | tcagcacactggcatagagg   | 250 bp | 56 °C |
| EEF2-5'                  | ctacctggccgagaagtacg   | 250 bp | 56 °C |
| EIF2B5-3'                | cctgactgtggagttgggat   | 151 bp | 57 °C |
| EIF2B5-5'                | aagagccaactgctctctgc   | 151 bp | 57 °C |
| EIF2S3-3'                | acgccagtgttttcaactc    | 236 bp | 55 °C |
| EIF2S3-5'                | cctatttctgcttagacgg    | 236 bp | 55 °C |
| GAPDH-3'                 | tcgccccacttgatttgg     | 106 bp | 55 °C |
| GAPDH-5'                 | gcaaattccatggcacctg    | 106 bp | 55 °C |
| Granulysin-3'            | gatctgctgggcagtttctc   | 227 bp | 56 °C |
| Granulysin-5'            | tgaccaaacacaggagctg    | 227 bp | 56 °C |
| HNRPDL-3'                | gtgagatcacccgtgtgtg    | 168 bp | 55 °C |
| HNRPDL-5'                | caggtttcagaggacctgga   | 168 bp | 55 °C |
| HSPE1-3'                 | cagcgactactgttgcttgc   | 154 bp | 55 °C |
| HSPE1-5'                 | gagggagtaatggcaggaca   | 154 bp | 55 °C |
| IL-3R $\alpha$ -3'       | cggacggtgtagttggtcactt | 102 bp | 60 °C |
| IL-3R $\alpha$ -3' (DNA) | gcctgagtcagaacgttggg   | 151 bp | 59 °C |
| IL-3R $\alpha$ -5'       | cgagtgtgtaaagacgccga   | 102 bp | 60 °C |
| IL-3R $\alpha$ -5' (DNA) | aggctggtctogaactcctg   | 151 bp | 59 °C |
| ITF2-3'                  | tcctccgaagatttctgtgc   | 208 bp | 57 °C |
| ITF2-5'                  | gaggcagccattctctctg    | 208 bp | 57 °C |
| ITGB4-3'                 | caggctgatgacgttcttga   | 180 bp | 60 °C |
| ITGB4-3' (DNA)           | gccctgagcccctattctta   | 248 bp | 60 °C |
| ITGB4-5'                 | aagaagatggggcagaacct   | 180 bp | 60 °C |
| ITGB4-5' (DNA)           | aaaaagagggggcctattga   | 248 bp | 60 °C |
| ITM2A-3'                 | tgctgcagggtcactatcag   | 166 bp | 55 °C |
| ITM2A-5'                 | ccgtggagagatgtgctttt   | 166 bp | 55 °C |
| NCOA6IP-3'               | ccagttcatggctcctcttc   | 187 bp | 56 °C |
| NCOA6IP-5'               | ggaaccaatgaggaagcaa    | 187 bp | 56 °C |
| NKG7-3'                  | caaagcaatcaggcagaaca   | 156 bp | 55 °C |
| NKG7-5'                  | gtgcacagcctccttctctc   | 156 bp | 55 °C |
| PIK3CG-3'                | gggttagcacaatggcact    | 155 bp | 57 °C |
| PIK3CG-5'                | ggcaaccttgttcttggaa    | 155 bp | 57 °C |
| PLZF-3'                  | cactctctctcgcccatag    | 361 bp | 56 °C |
| PLZF-5'                  | cagagcccttcagtctccac   | 361 bp | 56 °C |
| PSCDBP-3'                | ctttccacagcacgatgaa    | 200 bp | 57 °C |
| PSCDBP-5'                | aggagggggatgatttctg    | 200 bp | 57 °C |
| RREB1-3'                 | ctcactgcagagaacagcaa   | 139 bp | 55 °C |
| RREB1-5'                 | ctggcgtcttaacctatgga   | 139 bp | 55 °C |
| SMARCF1-3'               | agggagtggtccataaggtg   | 237 bp | 56 °C |
| SMARCF1-5'               | cctccggaggacagataca    | 237 bp | 56 °C |
| TCEB1-3'                 | cattggttctgctctcagca   | 214 bp | 56 °C |
| TCEB1-5'                 | agttcctggggaagcaaagt   | 214 bp | 56 °C |
| ZCCHC2-3'                | gtaggaagctggtggctgag   | 176 bp | 55 °C |
| ZCCHC2-5'                | caggctctctgttctacc     | 176 bp | 55 °C |

|           |                      |        |       |
|-----------|----------------------|--------|-------|
| ZNF211-3´ | ggcttctgcctcagaaactg | 350 bp | 56 °C |
| ZNF211-5´ | gagttcacacgggaaaaagg | 350 bp | 56 °C |
| ZNF236-3´ | tatagtcctgtcggggttcg | 201 bp | 57 °C |
| ZNF236-5´ | agctcactcaaaggcggtaa | 201 bp | 57 °C |

### 3.1.25 Software

Word 2000, Excel 2000, Microsoft

Primer Express™ 1.0, Applied Biosystems, CA, USA

Sequence Detector™ 1.6 und 1.7, Applied Biosystems, CA, USA

ABI Prism® 7700 Dissociation Curves 1.0, Applied Biosystems, CA, USA

### 3.1.26 www-Seiten

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Literatur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>

Sequenzvergleich: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Proteininformationen: <http://www.expasy.org/sprot/>

Allgemeine Informationen: <http://www.genecards.org/>

<http://www.genelinx.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturmethoden**

#### **3.2.1.1 Zelllinien**

Die Zelllinien sowie die kultivierten NK-Zellen und die transfizierten Zelllinien wurden in den jeweils angegebenen Kulturmedien in einer durchschnittlichen Dichte von bis zu  $10^6$ /ml im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte kultiviert.

#### **3.2.1.2 Zellen aus humanem Blut**

Für die Gewinnung von Zellen aus humanem peripheren Blut wurden "Buffy Coats" (durch Zentrifugation mit Leukozyten und Thrombozyten angereichertes Blut) verwendet, die von Dr. Torsten Tonn, Blutspendezentrale DRK Hessen Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden. Das für die Isolierung von NK-Zellen und CD34<sup>+</sup>-Zellen benötigte Nabelschnurblut (Cord Blood) wurde von PD Dr. Gesine Kögler, Nabelschnurblutbank der Heinrich Heine Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte für die mononukleären Zellen (PBMC) mithilfe des CELL DYN<sup>®</sup>. Es wurden je 250 µl der Zellsuspension verwendet, von denen ca. 200 µl vom Gerät aufgenommen und analysiert wurden. Neben weiteren Parametern wurden so der Gehalt an PBMC sowie der absolute und prozentuale Gehalt an Lymphocyten ermittelt.

Für die übrige Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellsuspensionen wurden vor dem Zählen im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau gemischt (je 20 µl). Um das definierte Volumen der Zählraster zu erhalten, wurde das Deckgläschen unter Druck auf die leicht befeuchteten Seitenstege der Zählkammer aufgeschoben, sodass es beim Kippen der Zählkammer haften blieb. Das Zellsuspensions-Trypanblau Gemisch wurde dann an den oberen bzw. unteren Rand

des Deckgläschens pipettiert. Gezählt wurde in Großfeldern =  $1 \text{ mm}^2$ , bestehend aus  $4 \times 4$  Kleinfeldern. Die Zellen in 4 Großfeldern wurden gezählt, das Ergebnis durch 2 geteilt und mit 10.000 multipliziert, wodurch die Zellzahl in 1 ml erhalten wurde.

#### **3.2.1.4 Durchflusszytometrie**

Zur Untersuchung der isolierten Zellfraktionen, der kultivierten NK-Zellen, sowie der transfizierten NK-Zellen und Zelllinien, wurden FACS Analysen durchgeführt. Hierzu wurden je etwa  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in PBS gewaschen, in je  $300 \mu\text{l}$  PBS/FCS resuspendiert und nach Zugabe der jeweiligen Fluorochromgekoppelten Antikörper für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und 7 Minuten bei 1500 rpm und  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Reaktionsgefäße auf Zellstofftuch abgetupft. Die sedimentierten Zellen wurden in je  $500 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert und zur FACS Analyse verwendet.

#### **3.2.1.5 Isolierung von Zellen**

Die NK-Zellen,  $\text{CD8}^+$  und  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, sowie  $\text{CD19}^+$  -Zellen wurden aus peripherem Blut von gesunden Spendern gewonnen. Zuerst wurden mittels Biocoll Separating Solution die PBMC isoliert. Die Blutbeutel wurden am Schlauchansatz geöffnet und das Blut wurde in 50 ml Reaktionsgefäße laufen gelassen. Es wurden je 15 ml Biocoll in 50 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und das Blut mittels 25-ml Einwegpipetten darauf geschichtet. Anschließend wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet wurde, um nicht die bei der Zentrifugation entstandenen Dichtezonen durch das Abbremsen zu vermischen. Der Serumüberstand wurde abpipettiert und der die PBMC enthaltende Interphasering wurde mittels steriler Pasteurpipetten in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Zum Waschen wurden die Reaktionsgefäße mit PBS aufgefüllt und für 7 Minuten bei 1500 rpm und  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Für ein erneutes Waschen wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen zuerst in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend mit PBS aufgefüllt und wieder für 7 Minuten bei 1500 rpm und  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert.

Nach dem Waschen wurde eine Erythrocytenlyse vorgenommen. Das Reaktionsgefäß mit den in PBS resuspendierten Zellen wurde mit Ammoniumchlorid-

Lösung aufgefüllt und unter gelegentlichem Schwenken für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (7 Minuten, 1500 rpm, 10 °C) von den lysierten Erythrocyten getrennt und wieder zweimal in PBS resuspendiert und gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die sedimentierten Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und 250 µl für die Zellzahlbestimmung entnommen.

### 3.2.1.6 Magnetische Zellseparation - MACS

Die NK-Zellen wurden als CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen mithilfe des CD56-MultiSort Kit isoliert. Die aus peripherem Blut gewonnenen PBMC wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 80 µl PBS/FCS pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und es wurden 20 µl CD56-beads pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde zum Waschen mit PBS/FCS aufgefüllt und für 7 Minuten bei 1500 rpm und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 5 ml PBS/FCS resuspendiert und auf die mit je 3 ml PBS/FCS äquilibrierten MACS LS Säulen aufgetragen. Um einem Verstopfen der MACS-Säulen vorzubeugen, wurden die Zellen vorher durch ein Zellsieb gegeben. Der Durchlauf wurde als CD56<sup>-</sup> Fraktion gesammelt. Mit je 3 x 3 ml PBS/FCS wurde gewaschen, wobei der Durchlauf ebenfalls als CD56<sup>-</sup> Fraktion gesammelt wurde. Die CD56<sup>+</sup> Fraktion wurde mit je 5 ml PBS/FCS eluiert. Für die Isolierung der NK-Zellen wurde die CD56<sup>+</sup> Fraktion weiter verwendet. Zunächst wurden die CD56-Beads durch Zugabe von Multisort-Release Reagent abgelöst. Die sedimentierte CD56<sup>+</sup> Fraktion wurde in 5 ml PBS/FCS resuspendiert und es wurden je 20 µl Release Reagent pro ml Zellsuspension zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Zum Waschen wurde der Ansatz mit PBS/FCS aufgefüllt und für 7 Minuten bei 1500 rpm und 10 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 50 µl PBS/FCS pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und es wurden je 30 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen Multisort-Stop Reagent zugegeben. Anschließend wurden CD3-beads zugegeben; 20 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen und der Ansatz für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde mit PBS/FCS gewaschen, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 500 µl PBS/FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben und auf zwei mit je 500 µl PBS/FCS resuspendierte MACS MS Säulen aufgetragen. Es wurde je 3 mal mit 500

$\mu\text{l}$  PBS/FCS gewaschen und der Durchlauf als  $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$  Fraktion gesammelt. Die  $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$  Fraktion wurde mit 1 ml PBS/FCS eluiert.

Für die Isolierung der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurde die  $\text{CD56}^-$  Fraktion verwendet. Es wurden 20  $\mu\text{l}$  CD8-Beads pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde mit PBS/FCS gewaschen und die sedimentierten Zellen in 7 ml PBS/FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gesiebt und auf mit je 3 ml PBS/FCS äquilibrierte MACS LS Säulen aufgetragen. Es wurde je 3 mal mit 3 ml PBS/FCS gewaschen und der Durchlauf als  $\text{CD56}^- \text{CD8}^-$  Fraktion gesammelt. Die  $\text{CD56}^- \text{CD8}^+$  Fraktion wurde mit je 5 ml PBS/FCS eluiert.

$\text{CD4}^+$  - und  $\text{CD19}^+$  -Zellen wurden ebenfalls aus PBMC gewonnen. Die  $\text{CD4}^+$  -Zellen sowie die  $\text{CD19}^+$  -Zellen wurden mit anti- $\text{CD4}^+$  -PE, bzw. anti- $\text{CD19}^+$  -PE markiert und anschließend mit anti-PE-microbeads isoliert.

Die  $\text{CD34}^+$  -Zellen wurden aus Apheresat mithilfe des Direkt  $\text{CD34}$  Progenitor Cell Isolation Kit isoliert.

### **3.2.1.7 Kultivierung von Zellen**

#### **3.2.1.7.1 Kultivierung von Zelllinien**

Die in 3.1.4 aufgeführten Zelllinien wurden in den in 3.1.5 aufgeführten Medien bei  $37^\circ \text{C}$ , wassergesättigter Luftfeuchte und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

#### **3.2.1.7.2 Kultivierung von NK-Zellen**

Die aus peripherem humanen Blut isolierten NK-Zellen wurden in NK-Medium (siehe 3.1.5) zu  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen und in 96er oder 12er Mikrotiterplatten kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen wurde ein Teil des verbrauchten Mediums durch frisches Medium ersetzt. Bei gutem Wachstum der Zellen wurde der Inhalt einer Kavität auf zwei neue Kavitäten verteilt, wobei jeweils mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

### **3.2.1.7.2.1 Kultivierung von NK-Zellen mit IL-15 und IL-21**

Aus peripherem humanen Blut wurden NK-Zellen mithilfe des NK Cell Isolation Kit isoliert und zu  $50 \times 10^6$  Zellen pro 50  $\mu$ l in RPMI 1640 mit 10 % humanem Serum und 1 % Penicillin-Streptomycin für eine Stunde inkubiert. Die NK-Zellen, die als Kontrolle dienten, wurden anschließend mit 1000 U/ml IL-2 kultiviert. Für die Kultivierung der NK-Zellen mit IL-15 wurden 5 ng/ $\mu$ l verwendet, für die Kultivierung mit IL-21 10 ng/ $\mu$ l. Nach drei Stunden Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und für die RNA-Präparation in RLT-Puffer aufgenommen.

### **3.2.1.7.3 Kultivierung von Zellen mit 5-Aza-2'-cytidin und Trichostatin A**

Die Stimulation von Zellen mit 5-Aza-2'-cytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA) wurde durch Kultivierung der Zellen in mit AZA oder TSA versetztem Medium durchgeführt. AZA wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M, TSA in einer Konzentration von 25 nM eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die parallel verarbeitet, aber in Medium ohne AZA oder TSA kultiviert wurden. Für eine Untersuchung der Wirkung von AZA und TSA zusammen wurden die Zellen in Medium kultiviert, das eine Mischung aus AZA und TSA enthielt.

## **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.2.1 Isolierung von RNA**

Zur Isolierung der Gesamt RNA wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in RLT Puffer mit Mercaptoethanol resuspendiert (1  $\mu$ l Mercaptoethanol pro 100  $\mu$ l Puffer RLT), wobei die Ansätze durch Pipettieren gemischt wurden, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Dieses Lysat wurde entweder bis zur Weiterverarbeitung bei 80 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Das eingefrorene Lysat wurde für die Verarbeitung für ca. 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Zur Verbesserung der Lyse wurden QIAshredder Säulchen verwendet. Das Lysat wurde auf die Säulen aufgetragen und für 2 Minuten

bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zum Durchlauf wurden je 500 µl 70 % Ethanol gegeben und durch pipettieren gemischt. Das Gemisch wurde auf RNeasy Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und jeweils 700 µl Puffer RW1 zum Waschen auf die Säulen gegeben. Es wurde für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säulchen auf frische Eppendorfgefäße überführt. Es wurde je 500 µl Puffer RPE aufgetragen und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf wurde wieder verworfen und es wurden erneut 500 µl Puffer RPE aufgetragen, für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Um eine Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden, wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Es wurden 10 µl DNase Stocklösung in 70 µl Puffer verdünnt und das Gemisch auf die Säule aufgetragen. Es wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden 350 µl Puffer RW1 aufgetragen, für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde zweimal mit je 500 µl Puffer RPE gewaschen, wie oben beschrieben. Die DNase verdaute RNA wurde mit je 30 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O eluiert, wobei wieder für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Die Proben wurden für eine Konzentrationsbestimmung im Photometer mit RNase freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben zu je 1 – 2 µg aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

### **3.2.2.2 Isolierung von RNA mittels Cäsiumchlorid-Gradient**

Bei größeren Mengen an Ausgangsmaterial wurde zur Isolierung von Gesamt-RNA ein Cäsiumchlorid-Gradient eingesetzt. Auf diese Weise konnten größere Mengen RNA isoliert werden, die anschließend für eine mRNA-Isolierung verwendet werden konnten. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, abzentrifugiert (1500 rpm, 7 min) und in GIT-Lösung resuspendiert (ca. 1 ml Lösung pro 10<sup>7</sup> Zellen). Die in GIT-Lösung resuspendierten Zellen wurden auf je 5 ml CsCl-Lösung geschichtet und über Nacht bei 40.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit abgegossen und das Röhrchen zum Trocknen umgedreht auf Zellstofftücher gestellt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

### 3.2.2.3 Isolierung von mRNA

Für die cDNA-Bank aus NK3.3- und Jurkat-Zellen wurde mRNA als Ausgangsmaterial verwendet. Hierzu wurde das Oligotex<sup>®</sup> mRNA Isolation Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Die Gesamt-RNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 250 µl aufgefüllt und es wurden 250 µl Puffer OBB zugegeben. Danach erfolgte eine Zugabe von je 15 µl Oligotex und eine Inkubation von 3 min bei 37 °C und von 10 min bei RT. Anschließend wurde für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Präzipitat in je 400 µl OW2 resuspendiert. Nach Auftragen auf Oligotex-Säulen wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Säulen anschließend auf neue Reaktionsgefäße übertragen. Es wurden erneut je 400 µl OW2 aufgetragen und wieder für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Säulen wieder auf neue Reaktionsgefäße übertragen und zur Elution der mRNA in einen Heizblock mit 70 °C gesetzt. Mit je 50 µl heißem OEB-Puffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm wurde dann die mRNA eluiert. Der letzte Schritt wurde hierbei wiederholt, es wurde der erste Durchlauf noch einmal zur Elution verwendet, zusätzlich zu weiteren 50 µl frischem OEB-Puffer, sodass die mRNA anschließend in 100 µl gelöst war.

### 3.2.2.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA-Lösungen und zur Kontrolle der Reinheit wurden photometrische Messungen durchgeführt. Die RNA-Lösungen wurden 1 : 10 in H<sub>2</sub>O verdünnt und es wurden jeweils 10 µl dieser Verdünnung eingesetzt. Als Referenz diente RNase freies H<sub>2</sub>O. Die Verdünnung wurde vom Photometer direkt in die Konzentrationsberechnung einbezogen, weshalb das Ergebnis nicht weiter umgerechnet werden musste. Die Angaben erfolgten in µg/µl. Die Reinheit der isolierten RNA wurde durch die Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient aus den beiden Messungen gibt Aufschluss über die eventuell vorhandene Verunreinigung durch Proteine. Bei der RNA-Isolierung mit RNeasy ergibt sich üblicherweise eine Reinheit der RNA von 1,9 bis 2,1.

### 3.2.2.5 Überprüfung der Integrität der RNA

Um die Integrität und Reinheit der RNA zu kontrollieren, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein denaturierender Auftragspuffer mit Formaldehyd und Formamid verwendet, mit dem die RNA im Verhältnis 1 : 5 versetzt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt wurde. Als Laufpuffer wurde ein ebenfalls formaldehydhaltiger Puffer verwendet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die RNA unter UV-Licht kontrolliert. Es sollten bei intakter RNA die Banden der 18S und der 28S rRNA deutlich sichtbar sein. Bei degradierter RNA sind diese beiden Banden durch RNA-Fragmente verbunden, die einen Schmier im Gel bilden. DNA-Kontaminationen hingegen sind als Bande weiter oben im Gel sichtbar. Es wurde nur RNA verwendet, die nach Kontrolle durch Gelelektrophorese als nicht DNA kontaminiert und intakt befunden wurde.

### 3.2.2.6 Herstellung von cDNA für PCR

Die cDNA wurde mit „iScript“ hergestellt. Hierbei handelt es sich um ein System, das ein Gemisch aus Poly-dT- und Random-Primer, sowie eine Reverse Transkriptase und Nukleotide enthält und einen 5-fach konzentrierten Reaktionspuffer.

|  |                |
|--|----------------|
| Herstellung der cDNA mit „iScript“:                | Inkubation:    |
| 20 µl Ansatz:                                      | 25 °C/5 min    |
| 4 µl iScript Reaction-Mix 5-fach                   | 42 °C/30 min   |
| 1 µl iScript Reverse Transkriptase                 | 85 °C/5 min    |
| x µl RNA (1 – 2 µg $\cong$ 0,5 – 10 µl Gesamt-RNA) | (Thermocycler) |
| x µl H <sub>2</sub> O (auf 20 µl auffüllen)        |                |

Der Gehalt an cDNA wurde photometrisch bestimmt, wobei die Proben 1 : 10 in H<sub>2</sub>O verdünnt wurden.

Für die PCR wurden die Proben durch Verdünnung mit H<sub>2</sub>O auf dieselbe Konzentration (80 ng/µl) eingestellt.

### 3.2.2.7 PCR zur Expressionskontrolle

Zur Überprüfung der Expression verschiedener Faktoren in unterschiedlichen Proben wurden PCRs durchgeführt. Hierbei wurden jeweils ca. 100 ng cDNA pro 25 µl-Ansatz eingesetzt, der 3'- und 5'-Primer je 0,4 µM, sowie der dNTP-Mix zu 0,2 mM.

Pipettierschema PCR:

|                           |               |
|---------------------------|---------------|
| 18,8 µl H <sub>2</sub> O  | PCR-Programm: |
| 2,5 µl 10 x Puffer        | 95 °C/2 min   |
| 0,5 dNTP-Mix              | 35 Zyklen:    |
| je 1 µl 3'- und 5'-Primer | 94 °C/30 s    |
| 1 - 2 µl cDNA             | 56 °C/30 s    |
| 0,15 µl Polymerase        | 72 °C/30 s    |

Für die unterschiedlichen Primer wurden unterschiedliche Anlagerungstemperaturen verwendet (siehe Tabelle 3.1).

### 3.2.2.8 Semiquantitative PCR

Als sensitivere Methode wurde zur Untersuchung der Expression die semiquantitative PCR verwendet. Hierzu wurde die PCR ab dem 15. Zyklus am Ende des dritten Schrittes kurz unterbrochen und ca. 6 µl aus dem Gefäß entnommen. Dieses wurde bis zum Ende der PCR alle 2 oder 3 Zyklen wiederholt und die gesammelten PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert. So konnte verfolgt werden, wie mit zunehmender Zyklusanzahl das PCR-Produkt zunimmt und es wird sichtbar, wie früh das erste PCR-Produkt vorhanden ist. Es konnte also annähernd die lineare Phase der PCR betrachtet werden.

### 3.2.2.9 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Länge und das Vorhandensein von Nebenprodukten überprüft. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Es wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt, 3 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl Auftragspuffer gemischt und auf ein 1,2 % Agarosegel in 1 x TBE

aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für durchschnittlich 1 h bei etwa 9 V/cm durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel unter UV-Licht analysiert.

### 3.2.3 Subtraktive cDNA-Banken/PCR-Select Methode

Zur Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken wurde das PCR-Select Kit von Clontech verwendet. Das Prinzip ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Es werden zwei Zellpopulationen verwendet, von denen die eine als "Tester" und die andere als "Driver" bezeichnet wird. Der "Tester" ist hierbei die Zellpopulation, für die nach Beendigung der Subtraktion eine subtraktive cDNA-Bank erstellt wird. Die cDNA für den "Tester" wird jeweils zur Hälfte mit dem Adaptor 1 und dem Adaptor 2R versehen. Die Sequenzen der Adaptoren sind in Abbildung 3.2 gezeigt. In der Hybridisierung, die die eigentliche Subtraktion darstellt, wird dann getrennt die cDNA mit Adaptor 1 und mit Adaptor 2R jeweils mit der zu subtrahierenden cDNA, die keine Adaptoren besitzt, vermischt. Hierbei können sich komplementäre Sequenzen aneinander anlagern - sowohl Sequenzen, die dem "Tester", also der eigentlichen Probe angehören, als auch Sequenzen, die dem "Driver", also der Zellpopulation, die von der Probe subtrahiert werden soll, angehören. Es kommt zur Bildung von verschiedenen Hybriden, die in der Abbildung als "a", "b", "c" und "d" bezeichnet sind. Im zweiten Schritt der Hybridisierung wird dann frisch denaturierter "Driver" zugegeben, ohne dass die zuvor gebildeten Hybride noch einmal denaturiert werden. So können nur die im ersten Schritt nicht hybridisierten cDNA-Moleküle mit dem frischen "Driver" hybridisieren und es entstehen Moleküle, die in der Abbildung als "e" bezeichnet werden. Diese Moleküle sollen seltene, differentiell exprimierte Sequenzen repräsentieren. In der sich an die Hybridisierung anschließenden PCR werden die einzelsträngigen Enden der Adaptoren aufgefüllt und durch die Verwendung eines Primers, der zu den aufgefüllten Adaptorsequenzen komplementär ist, werden die cDNA-Moleküle amplifiziert, wobei die "e"-Moleküle als einzige exponentiell amplifiziert werden. Die Moleküle "a" und "d" werden nicht amplifiziert, die Moleküle "b" bilden eine Struktur, die ebenfalls eine Amplifikation verhindert und die Moleküle "c" werden nur linear amplifiziert.

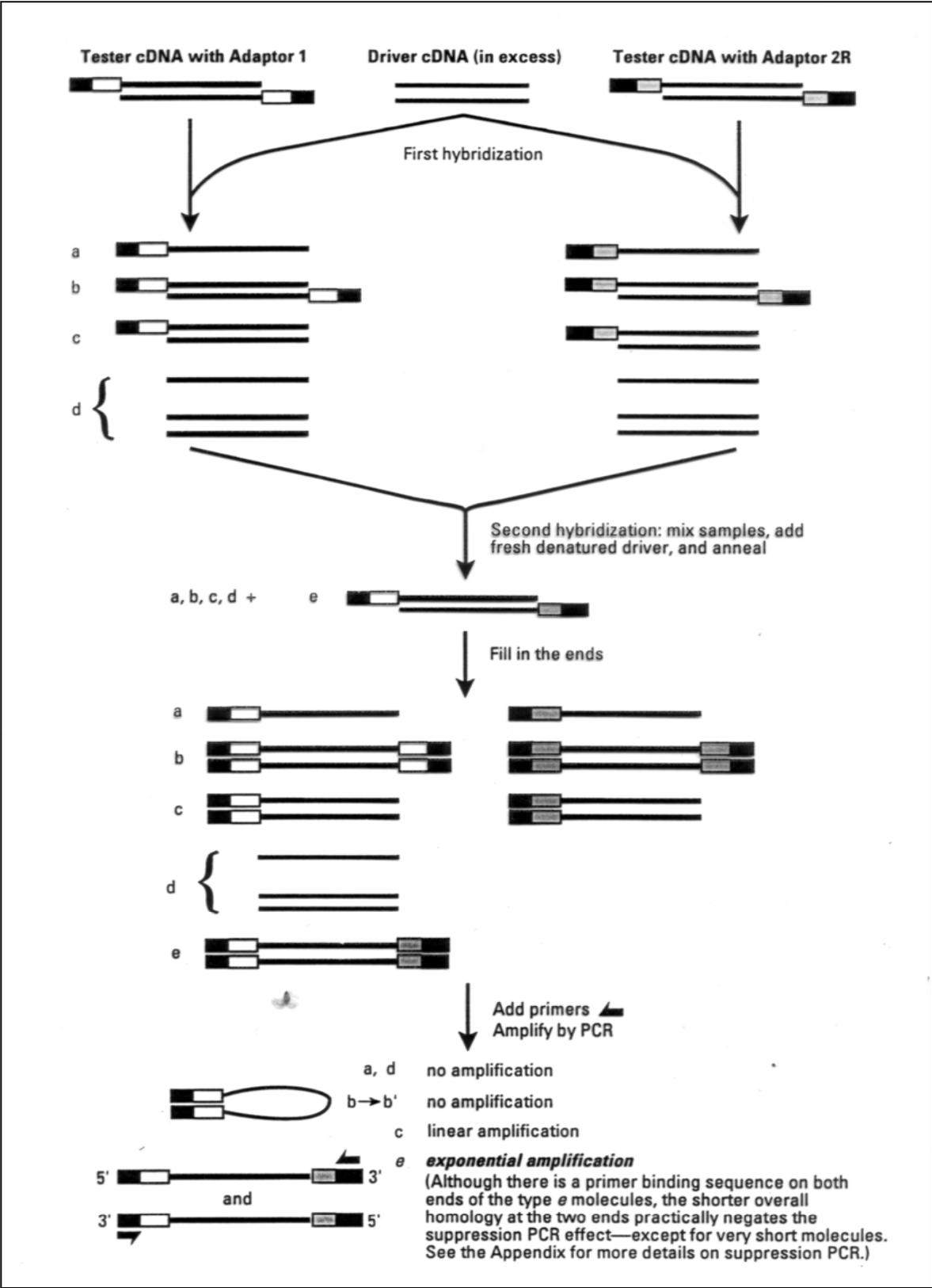


Abb. 3.1: PCR-Select cDNA Subtraktion Schema (www. clontech. com).

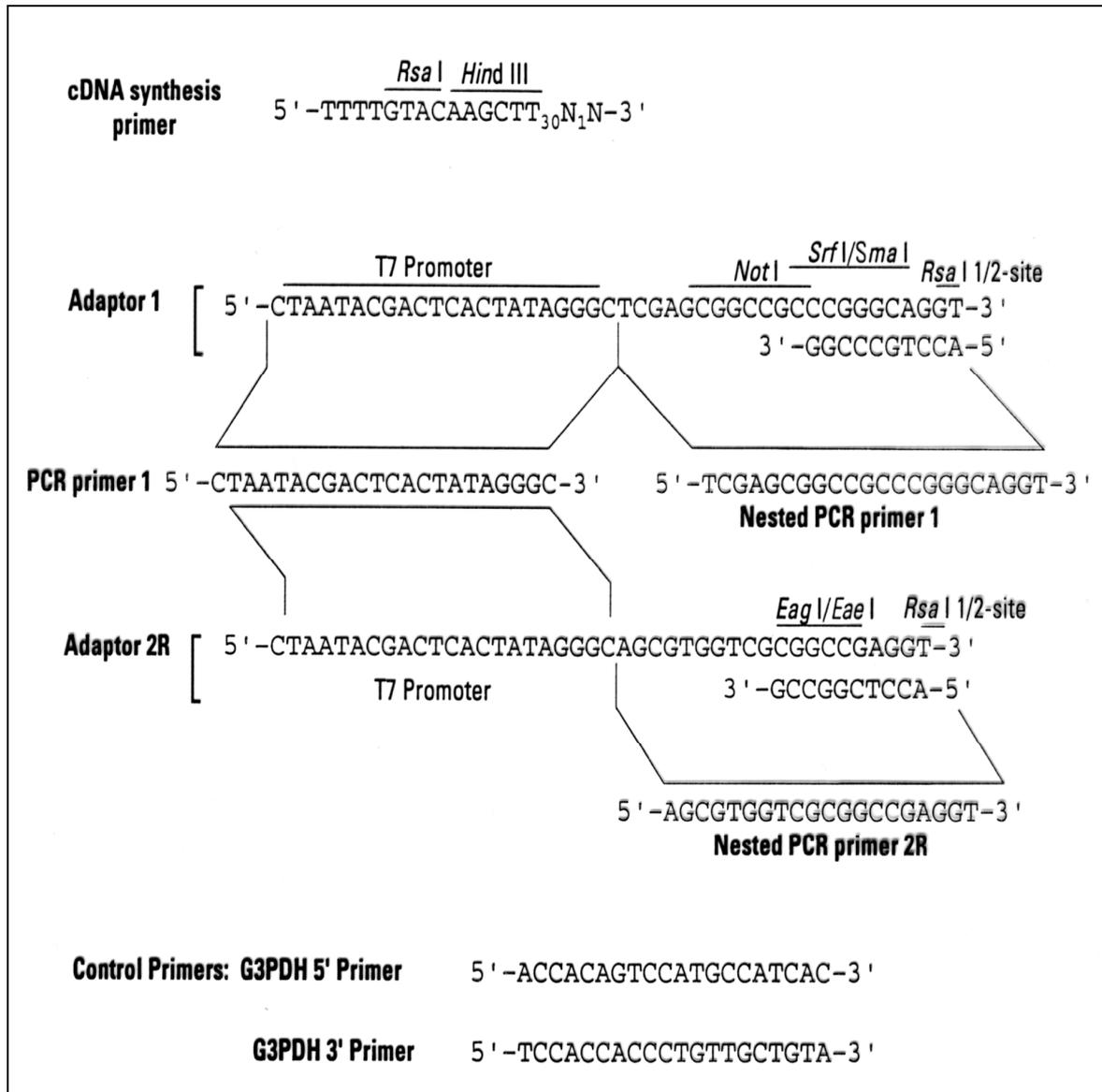


Abb. 3.2: Sequenzen der Primer und Adaptoren für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken. (www.clontech.com).

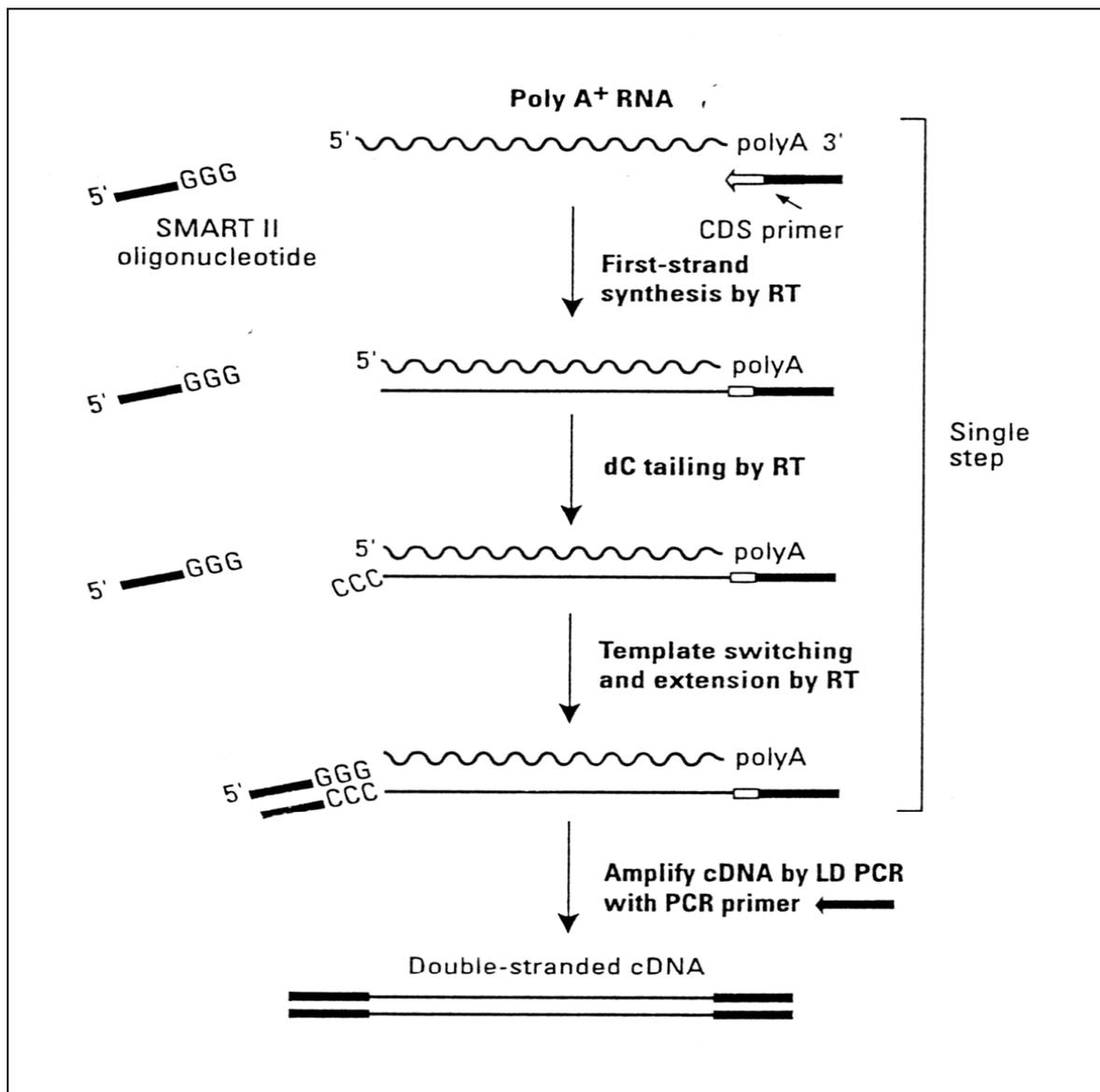


Abb. 3.3: Schema zur SMART™ Technologie. Manual SMART™ cDNA Amplification (www.clontech.com).

### 3.2.3.1 cDNA-Synthese

Als Ausgangsmaterial für die subtraktive cDNA-Bank sollte im Idealfall mRNA verwendet werden. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit an Zellen musste aber darauf verzichtet und Gesamt-RNA verwendet werden. Um trotzdem eine möglichst hohe Ausbeute bei der cDNA-Synthese zu erreichen, wurde das SMART System angewandt (siehe Abbildung 3.3). Hierbei wird zusätzlich zu einem Poly-dT-Primer das SMART II Oligonucleotid verwendet, das sich erst nach vollständiger Translation des jeweiligen RNA-Moleküls an das entgegengesetzte Ende anlagert. Die spezielle

Reverse Transkriptase, die bei dieser Technik verwendet wird, hängt bei Erreichen des 5' Endes durch ihre terminale Transferase Aktivität einige zusätzliche Nucleotide, hauptsächlich Deoxycytidin, an den cDNA-Strang an. An diese zusätzlichen Nucleotide lagert sich das SMART II Oligonucleotid an. Es werden nur cDNA-Moleküle mit den Sequenzen sowohl des Poly-dT-Primers als auch des SMART II Oligonucleotides in der Zweitstrangsynthese amplifiziert, da beide Sequenzen für den verwendeten PCR-Primer die Bindungsstelle aufweisen. Durch diese Technik soll verhindert werden, dass unvollständig transkribierte cDNAs, kontaminierende genomische DNA oder cDNA aus poly A-RNA exponentiell amplifiziert werden. Die Reverse Transkriptase, die für die SMART-Technik verwendet wird, ist eine MMLV mit RNase H<sup>-</sup> Punktmutation.

Für die Erststrangsynthese wurde bis zu 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von bis zu 3 µl eingesetzt. Die beiden Primer CDS-Primer und SMART II Oligonucleotid wurden zu je 1 µl bei einer Konzentration von je 10 µM zugegeben. Mit DEPC-H<sub>2</sub>O wurde auf 5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde nach Mischen und kurzem Zentrifugieren für 2 Minuten in einem Heizblock auf 70 °C erhitzt. Danach wurde kurz zentrifugiert und der Ansatz auf Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurden die übrigen Reagentien für die Erststrangsynthese zugegeben; 2 µl 5-fach Erststrangpuffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP, und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (Superscript II). Nach Mischen wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 42 °C in einem Heizblock inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Reaktionsprodukt der Erststrangsynthese in TE-Puffer verdünnt. Bei Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial wurden 40 µl TE-Puffer verwendet, bei mehr als 0,2 µg poly A-RNA wurden 450 µl TE-Puffer verwendet. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die verdünnten Ansätze für 7 Minuten auf 72 °C in einem Heizblock erhitzt. Danach wurde die Einzelstrang-cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.2.3.2 Zweitstrangsynthese**

Die Zweitstrangsynthese wurde mit nur einem Primer, dem PCR-Primer, durchgeführt, da beide Enden der Erststrang-cDNA die gleichen Bindungsstellen für diesen Primer besitzen. Als Polymerase wurde der Advantage 2 Polymerase-Mix (Clontech) verwendet, der aus einer Primären und einer Proofreading Polymerase besteht. Die Verwendung beider Enzyme soll eine Amplifikation langer cDNAs

ermöglichen, zu einer geringen Fehlerrate und hoher Effizienz und Ausbeute führen. Zusätzlich ist der Polymerase-Mix mit einem TaqStart-Antikörper ausgestattet, der einen automatischen Hotstart ermöglicht, da der Antikörper die Aktivität der Polymerasen bei niedrigen Temperaturen und somit die Entstehung von unspezifischem PCR-Produkt verhindert. Bei hohen Temperaturen wird der Antikörper denaturiert und die Polymerasen werden aktiv.

Aus der Erststrangsynthese wurden je nach Ausgangsmaterial unterschiedliche Verdünnungen eingesetzt. Von den Proben, die als Ausgangsmaterial 1 µg Gesamt-RNA hatten, wurde 1 µl der ss cDNA verwendet, von den Proben, bei denen 0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde, wurden 2 µl ss cDNA verwendet und von den Proben, die als Ausgangsmaterial 1 µg poly A-RNA hatten, wurde ebenfalls 1 µl ss cDNA verwendet, bzw. bei 0,5 µg 2 µl ss cDNA. Das Erststrangprodukt wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und es wurden je 74 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Advantage 2 PCR-Puffer, 2 µl 10 mM dNTP, 2 µl 10 µM PCR-Primer und 2 µl Advantage 2 Polymerase-Mix zugegeben. Von jeder Probe wurden 3 Ansätze hergestellt, um eine Optimierung der Zweitstrangsynthese zu ermöglichen. Zwei der Ansätze wurden nach den ersten 15 Runden der PCR aus dem PCR-Gerät entnommen und im Kühlschrank aufbewahrt. Der dritte Ansatz wurde weiteren PCR-Amplifikationen unterworfen, wobei alle 2 Runden jeweils 10 µl der Probe entnommen und später gelelektrophoretisch analysiert wurden. Es wurden jeweils 8 µl der entnommenen Proben auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. So konnte der Verlauf der Amplifikation verfolgt werden und die optimale Anzahl an PCR Zyklen bestimmt werden. Die ds cDNA soll sich idealerweise in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden, welche erreicht ist, wenn die Ausbeute an PCR-Produkt nicht mehr mit der Anzahl an PCR Zyklen ansteigt. Die ds cDNA ist auf dem Agarosegel als Schmier mit einzelnen Banden zu sehen. Bis zum Erreichen der exponentiellen Phase der Amplifikation ist mit jedem Zyklus mehr ds cDNA zu sehen, bis dann eine Stagnation bei etwa 20 bis 21 Zyklen zu beobachten ist. Es wurde die Zyklusanzahl als optimal bestimmt, die eins unter der Anzahl lag, die gelelektrophoretisch bestimmt wurde. Eine Überamplifikation der cDNA würde das Anhäufen von unspezifischen Produkten fördern, während eine Unteramplifikation zu einer zu geringen Ausbeute an PCR-Produkt führen würde. Die im Kühlschrank aufbewahrten Proben wurden nach Bestimmung der optimalen Zyklusanzahl wieder in das PCR-Gerät überführt und die noch fehlenden Amplifikationsrunden wurden nachgeholt.

Nach Beendigung der Amplifikation wurden die fertigen ds cDNAs zu je 5 µl auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen und kontrolliert. Der Gehalt an ds cDNA wurde in 1 : 10 Verdünnungen in H<sub>2</sub>O photometrisch bestimmt. Vor der weiteren Verarbeitung wurde die ds cDNA mit QIAquick gereinigt. Hierzu wurden je 100 µl ds cDNA mit 500 µl Puffer PB gemischt und auf eine QIAquick-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm wurde der Durchlauf verworfen und die Säule mit jeweils 750 µl Puffer PE gewaschen (Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm), der Durchlauf verworfen und die Säulen nochmals leer zentrifugiert, um den restlichen Alkohol von der Membran zu entfernen. Die Säule wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt und die gereinigte ds cDNA mit je 50 µl Puffer EB durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 Minute eluiert.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die ds cDNA bei –20 °C aufbewahrt.

### 3.2.3.3 Restriktionsverdau mit *RsaI*

Um die ds cDNA für die spätere Hybridisierung vorzubereiten, wurde ein *RsaI*-Verdau durchgeführt. Zum einen sollten die DNA-Moleküle auf eine Länge von etwa 600 bp verkürzt werden, um eine möglichst effiziente Hybridisierung zu erreichen. Zum anderen werden durch den Verdau mit *RsaI* Ligationsstellen für die Adaptoren geschaffen, die für die Subtraktion benötigt werden.

Es wurden jeweils etwa 40 µl der gereinigten ds cDNA eingesetzt, je 5 µl wurden für eine spätere Gelelektrophorese zurückbehalten. Pro Ansatz wurden 5 µl React 3 Puffer und 1,5 µl *RsaI* zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Inkubiert wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C im Heizblock.

### 3.2.3.4 Kontrolle des Restriktionsverdaus

Nach Inkubation wurden je 5 µl zusammen mit je 5 µl der unverdauten ds cDNA auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. So konnte der erfolgreiche Verdau der cDNA kontrolliert werden; die unbehandelte cDNA sollte als Schmier von 0,5 – 10 kb zu sehen sein, die verdaute cDNA hingegen als Schmier von 0,1 – 2 kb.

### 3.2.3.5 Adaptorligation

Für die cDNA-Subtraktion nach dem PCR-Select™-Prinzip werden die cDNA-Populationen in „Tester“ und „Driver“ unterteilt. Die „Tester“-Moleküle bekommen mit sogenannten Adaptoren definierte Sequenzen an beiden Enden, die in einer PCR nach der Hybridisierung als Bindestelle für einen Primer dienen. Jeder „Tester“ wird in zwei Fraktionen aufgeteilt, die jeweils einen der beiden Adaptoren bekommen, die sich an das 5´ Ende anlagern.

Die Adaptoren, die an die cDNA ligiert werden, sind nicht phosphoryliert und an einem Ende doppelsträngig. So wird erreicht, dass nur ein Ende, das 3´-Ende des Adaptors, an das 5´-Ende der cDNA (welches eine Phosphatgruppe besitzt) ligiert wird. Werden die beiden Stränge der cDNA durch Denaturierung getrennt, ist nur noch ein Strang mit dem Adaptor verbunden.

Die Ligation wurde teilweise mit bereits hybridisierten Adaptoren (Kit PCR-Select™) durchgeführt, teilweise mit selbst hybridisierten Adaptoren.

### 3.2.3.6 Hybridisierung der Adaptoren

Zur Hybridisierung wurden die beiden lyophilisierten Adaptoren und ihre komplementären Oligonukleotide zu 10 µM in 10 mM Tris, pH 7,5 gelöst. Daraus wurden je 3,25 µl pro Ansatz verwendet und jeweils 1,5 µl 10-fach annealing buffer und 8,5 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Es wurde für 5 Minuten bei 90 °C im Heizblock inkubiert, danach wurde der Heizblock ausgeschaltet, damit der Hybridisierungsansatz langsam auf Raumtemperatur abkühlen konnte.

Für die Adaptorligation wurde die *Rsal*-verdaute ds cDNA zu 2 µl mit 5 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden 2 µl ds cDNA mit 2 µl Adaptor 1 oder Adaptor 2 gemischt, 3 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 5-fach Puffer und 1 µl Ligase

### 3.2.3.7 Kontrolle der Adaptorligation/Ligationseffizienztest

Um die Ligation der Adaptoren an die cDNA zu kontrollieren, wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Primer verwendet; ein für das housekeeping Gen *G3PDH* spezifisches Primerpaar (*G3PDH*-3´ und *G3PDH*-5´) und

ein Primer, der sich an die den beiden Adaptoren gemeinsame Sequenz anlagert (PCR-Primer 1). Für jede Probe wurden zwei Ansätze erstellt, ein Ansatz mit G3PDH-3' und G3PDH-5' und ein Ansatz mit PCR-Primer 1 und G3PDH-3'. Für beide Ansätze wurden PCR-Produkte unterschiedlicher Längen erwartet. Das Produkt für die beiden G3PDH-Primer ist 450 kb lang, das Produkt für die Primer PCR-Primer 1 und G3PDH-3' ist 750 kb lang. Dieses Produkt entsteht nur, wenn an das cDNA-Molekül, an das der G3PDH-3' Primer bindet, ein Adaptor ligiert ist. Somit ist eine Kontrolle der Effizienz der Adaptorligation möglich. Die Intensität der Banden für die beiden Fragmente soll sich nicht um mehr als das 4-fache unterscheiden. Wenn die Intensität der längeren Bande weniger als  $\frac{1}{4}$  der Intensität der kürzeren Bande beträgt, war die Ligationseffizienz unter 25 %.

Für die Kontrolle der Ligationseffizienz wurden folgende Ansätze pipettiert:

Die ligierten cDNAs wurden in H<sub>2</sub>O verdünnt: 1 µl ligierte cDNA + 20 µl H<sub>2</sub>O.

Je 5 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert.

Ansatz 1:

1 µl tester x – 1  
 1 µl G3PDH-3'-Primer  
 1 µl PCR-Primer 1  
 18,5 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10 x Puffer  
 0,5 µl dNTP-Mix  
 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix

Ansatz 2:

1 µl tester x – 1  
 1 µl G3PDH-3'-Primer  
 1 µl G3PDH-5'-Primer  
 18,5 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10 x Puffer  
 0,5 µl dNTP-Mix  
 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix

Ansatz 3:

1 µl tester x – 2  
 1 µl G3PDH-3'-Primer  
 1 µl PCR-Primer 1  
 18,5 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10 x Puffer  
 0,5 µl dNTP-Mix  
 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix

Ansatz 4:

1 µl tester x – 2  
 1 µl G3PDH-3'-Primer  
 1 µl G3PDH-5'-Primer  
 18,5 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10 x Puffer  
 0,5 µl dNTP-Mix  
 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix

PCR-Bedingungen:

75 °C/5 min

94 °C/30 s

20 Zyklen:

94 °C/10 s

65 °C/30 s

68 °C/2,5 min

### 3.2.3.8 Hybridisierung

Wenn die Adaptorligation erfolgreich war, wurden die "Tester" und "Driver" cDNAs miteinander hybridisiert. Die Hybridisierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die beiden "Tester" „Tester 1“ und „Tester 2“ getrennt mit dem "Driver" hybridisiert. Hierbei sollten sich die cDNAs, die dieselbe Sequenz haben, aneinander lagern. Dies geschieht sowohl mit komplementären Sequenzen, die beide aus dem jeweiligen "Tester" stammen, als auch mit komplementären Sequenzen, die aus dem "Tester" und aus dem "Driver" stammen. Direkt nach der ersten Hybridisierung wurde die zweite Hybridisierung durchgeführt, wobei diesmal die "Tester" nicht denaturiert wurden. Somit blieben die Doppelstränge der bereits hybridisierten Moleküle zusammen und nur die cDNAs, die bisher keinen Hybridisierungspartner gefunden hatten, konnten mit dem denaturierten und damit einzelsträngigen "Driver" hybridisieren.

Pipettierschema 1. Hybridisierung:

Ansatz für Adaptor 1-ligierten tester x – 1:

1,5 µl driver cDNA

1,5 µl Adaptor 1-ligierter tester x – 1

1 µl 4-fach Hybridisierungspuffer

Ansatz für Adaptor 2-ligierten tester x – 2:

1,5 µl driver cDNA

1,5 µl Adaptor 2-ligierter tester x – 2

1 µl 4-fach Hybridisierungspuffer

Zu den Ansätzen wurde je ein Tropfen Mineralöl gegeben, um das Verdunsten der Proben während der Hybridisierung und dem späteren Mischen zu verhindern. Die Ansätze wurden im Thermocycler für 1,5 Minuten auf 98 °C erhitzt und anschließend für 8 Stunden bei 68 °C inkubiert.

Nach der 8-stündigen Inkubation wurde die zweite Hybridisierung angeschlossen. Es wurde frischer "Driver", je 1 µl, gemischt mit 1 µl 4-fach Hybridisierungspuffer und 2 µl H<sub>2</sub>O, für 1,5 Minuten bei 98 °C denaturiert. Der denaturierte "Driver" wurde dann folgendermaßen mit dem "Tester x – 1" und "Tester x – 2" gemischt; zuerst wurde der gesamte "Tester x – 2" in einer Pipettenspitze aufgenommen, wobei die Pipette auf ein größeres Volumen eingestellt war. Dann wurde etwas Luft aufgenommen, um zu verhindern, dass sich der anschließend aufgenommene "Driver" schon in der Pipettenspitze mit dem "Tester x – 2" mischt. Danach wurde beides in den Ansatz mit "Tester x – 1" gegeben und durch pipettieren gemischt. So konnten die beiden "Tester" gleichzeitig mit dem frisch denaturierten "Driver" gemischt werden.

### **3.2.3.9 1. PCR nach Hybridisierung**

Nach den beiden Hybridisierungen mussten noch zwei PCR's durchgeführt werden, um die differentiell exprimierten Sequenzen aus den übrigen herauszufiltern. Bei der ersten Amplifikation wurde wieder der PCR-Primer 1 verwendet, der komplementär zur Sequenz der beiden Adaptoren ist. Hierbei mussten in einem Schritt vor der eigentlichen PCR die Enden der cDNAs komplementär zu den Adaptoren aufgefüllt werden. Diese Reaktion wurde für 5 Minuten bei 75 °C durchgeführt.

Es wurden jeweils 1 µl der verdünnten cDNA aus der Hybridisierung und aus den nicht hybridisierten verdünnten "Tester"-Kontrollen pro Ansatz verwendet. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 1 µl der „PCR control subtracted cDNA“ erstellt. Es wurden jeweils 19,5 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10x Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix, 1 µl PCR-Primer 1 und 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix eingesetzt.

PCR-Programm: 75 °C/5 min  
94 °C/25 s  
27 Zyklen: 94 °C/10 s  
66 °C/30 s  
72 °C/1,5 min

Nach der ersten PCR wurde eine Kontrolle der Reaktion durchgeführt. Es wurden je 8 µl PCR-Produkt jeder Probe auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei sollten sich in der Kontrollsubtraktion der Skelettmuskel-cDNA die  $\phi$ X174/*Hae*III-Banden zeigen. Für die übrigen Proben wurde ein Schmier zwischen 0,2 und 2 kb mit mehr oder weniger distinkten Banden erwartet.

### 3.2.3.10 2. PCR nach Hybridisierung

Nach positiver Kontrolle der ersten PCR wurden die PCR-Produkte in H<sub>2</sub>O verdünnt; je 3 µl PCR-Produkt in 27 µl H<sub>2</sub>O. Davon wurden je 1 µl in die zweite PCR eingesetzt. Dazu wurden 18,5 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10 x Puffer, 1 µl Nested Primer 1, 1 µl Nested Primer 2R, 0,5 µl dNTP-Mix und 0,5 µl Advantage Polymerase-Mix gegeben.

PCR-Programm: 12 Zyklen: 94 °C/10 s  
68 °C/30 s  
72 °C/1,5 min

Je 8 µl PCR-Produkt wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert.

Hierbei sollten die kontrollsubtrahierte Probe aus dem Kit und die Skelettmuskel-Probe mit den  $\phi$ X174/*Hae*III-Fragmenten dasselbe Bandenmuster zeigen. Die kontrollsubtrahierte Probe ist eine  $\phi$ X174/*Hae*III-Fragmente enthaltende Probe, die von Clontech mit der PCR-Select-Methode subtrahiert wurde und im Kit enthalten ist. Zur Unterscheidung wird diese Probe im Folgenden als kontrollsubtrahierte Probe bezeichnet, während die selbsterstellte Probe mit  $\phi$ X174/*Hae*III-Fragmenten als Kontrolle bezeichnet wird.

### 3.2.3.11 Ligation der PCR-Produkte

Nach der zweiten PCR wurde das PCR-Produkt sofort in den Vektor pCR2.1 kloniert, um zu verhindern, dass bei längerer Lagerung die T/A-Überhänge verloren gehen. Abbildung 3.4 zeigt die Vektorkarte für pCR2.1 mit der vergrößerten "multiple cloning site", in die das PCR-Produkt kloniert werden kann. Für die spätere Sequenzierung

der Inserts besitzt der Vektor Bindestellen für M13- oder T7-Primer. Für eine Selektion auf vektortragende Bakterien über das Medium sind eine Ampicillin- und eine Kanamycinresistenz vorhanden. Durch eine Klonierung in das *lacZ*-Gen können mittels blau-weiß-Selektion die Klone gefunden werden, die einen Vektor mit Insert tragen (siehe 2.2.3.14). Es wurden je 3 µl PCR-Produkt, 1 µl Ligationspuffer (TA Cloning Kit), 2 µl Vektor pCR2.1 (TA Cloning Kit), 3 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Ligase (TA Cloning Kit) gemischt und über Nacht bei 14 °C im Heizblock inkubiert.

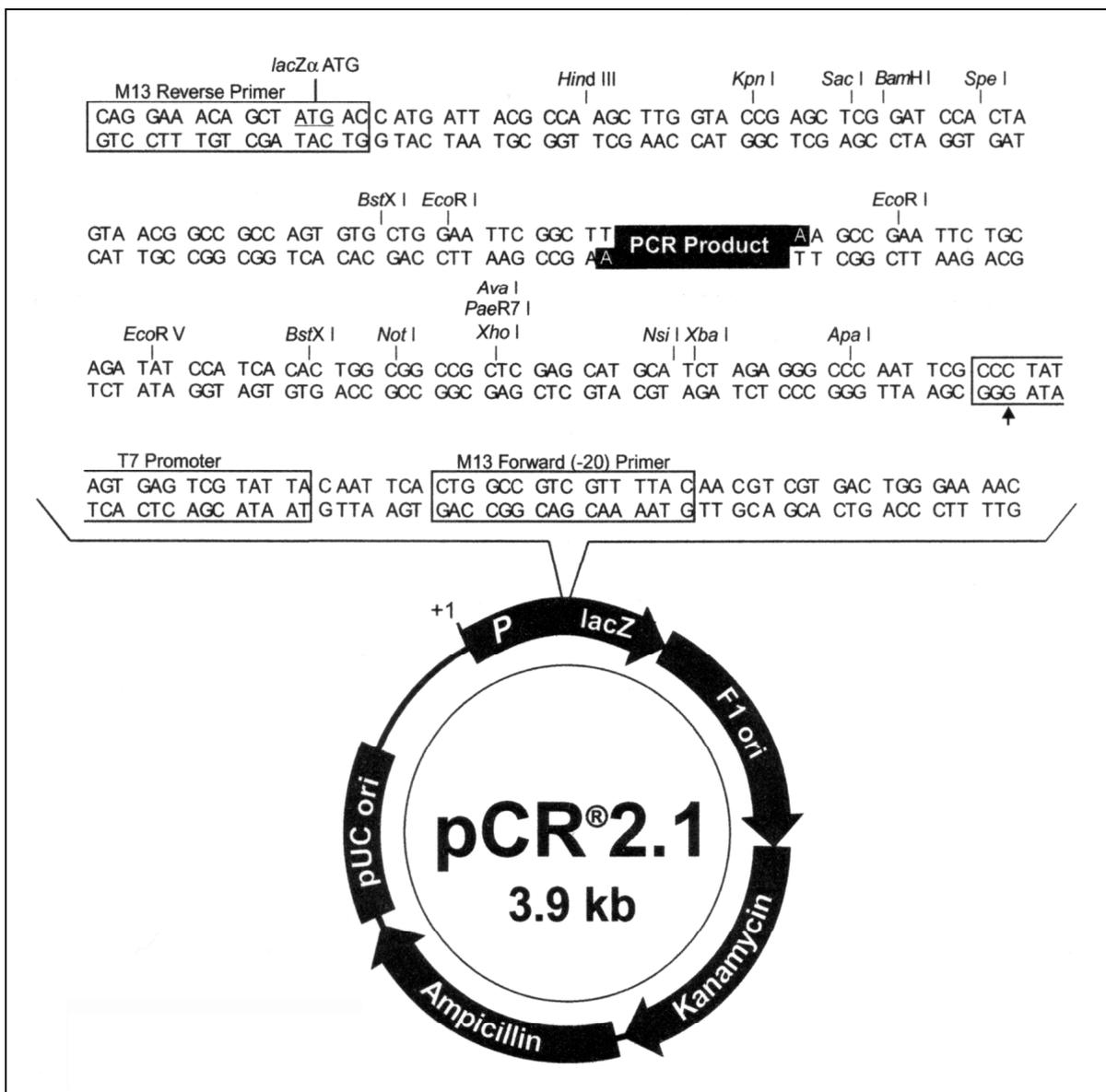


Abb. 3.4: Vektorkarte für pCR2.1 (www. clontech. com).

### 3.2.3.12 Subtraktionseffizienzkontrolle

Das Ergebnis der Subtraktion wurde durch eine Subtraktionseffizienzkontrolle untersucht. Hierzu wurde eine PCR mit G3PDH-Primern durchgeführt und in einer Gelelektrophorese verglichen, in welchen Proben PCR-Produkte vorhanden sind. In den unsubtrahierten Proben sollte viel G3PDH-Amplifikationsprodukt vorhanden sein, in den subtrahierten Proben dagegen nur noch wenig. Um auch geringe Unterschiede in der Amplifikation sichtbar zu machen, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt, bei der nach dem 18., dem 23. und dem 28. Zyklus je 6 µl der Probe entnommen wurden.

Pipettierschema Subtraktionseffizienzkontrolle:

Das zweite PCR-Produkt wurde 1 : 10 in H<sub>2</sub>O verdünnt, davon wurde 1 µl in die PCR eingesetzt.

1,2 µl G3PDH-3'-Primer

1,2 µl G3PDH-5'-Primer

22,4 µl H<sub>2</sub>O

3 µl 10 x Puffer

0,6 µl dNTP-Mix

0,6 µl Advantage Polymerase-Mix

PCR-Programm:

18 Zyklen:

94 °C/30 s

60 °C/30 s

68 °C/ 2 min

Je 5 µl der PCR-Produkte wurde auf einem 2 % Agarosegel analysiert.

### 3.2.3.13 Transformation in *E. coli*

Die in den Vektor pCR2.1 ligierten PCR-Produkte wurden in chemisch kompetente Zellen des *E. coli* Stammes TOP10F' transformiert.

Es wurde jeweils ein Aliquot der bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut und je  $2\text{ }\mu\text{l}$  der Ligation zugegeben und mit der Pipettenspitze gemischt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock von  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz wieder auf Eis gestellt und es wurden je  $250\text{ }\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben. Anschließend wurde für 1 Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 300 rpm im Schüttelheizblock inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden je 50 bzw.  $100\text{ }\mu\text{l}$  pro Agarplatte verteilt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden sie mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3.14 Blau-weiß-Selektion

Für die Plasmidpräparation und spätere Sequenzierung sollten nur Klone ausgewählt werden, die sowohl den transformierenden Vektor als auch ein Insert im Vektor tragen. Hierzu wurde die sogenannte Blau-weiß-Selektion verwendet. Für dieses Selektionsverfahren sind *E. coli* Stämme notwendig, die eine Deletion im *lacZ'*-Gen enthalten (*lacZ* $\Delta$ M15) und somit keine  $\beta$ -Galactosidase mehr bilden können. Klonierungsvektoren wie pCR2.1 führen durch das *lacZ'*-Gen zur Komplementation des  $\beta$ -Galactosidase-Defekts. Zellen, die mit einem solchen Vektor transformiert wurden, können das chromogene  $\beta$ -Galactosid X-Gal spalten, wobei ein Farbstoff freigesetzt wird, der durch Luftoxidation blau wird und die Zellen anfärbt. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranosid wird indirekt (Bindung des Lac-Repressors) die Transkription der  $\beta$ -Galactosidase induziert. Die bekannten Klonierungsvektoren enthalten im *lacZ* eine multiple Klonierungsstelle (MCS), so dass die Ligation des Vektors mit einem Insert dazu führt, dass das *lacZ'*-Gen unterbrochen und somit die Bildung einer funktionierenden  $\beta$ -Galactosidase unmöglich wird. Die Zellen bleiben also weiß, wenn ein Insert enthalten ist. Zellen ohne Vektor, bei denen die Transformation nicht erfolgreich war, werden durch eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz negativ selektiert.

### 3.2.3.15 Analytische Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Minipräps durchgeführt. Es wurden je 2,5 ml LB/Kanamycin-Medium in eine kleine Petrischale gefüllt und je eine Bakterienkolonie dazugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA mithilfe des QIAprep Spin Kits isoliert.

Der gesamte Ansatz wurde in ein 2-ml Eppendorfgefäß gegeben und bei 10.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen wurden in je 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden je 250 µl Puffer P2 zur Lyse der Zellen zugegeben und der Ansatz gemischt. Zur Neutralisierung wurden je 350 µl Puffer N2 zugegeben und wieder gemischt. Danach wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände auf die Säulchen gegeben. Diese wurden dann für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurden je 750 µl Puffer PE zum Waschen zugegeben. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und die Zentrifugation zum Entfernen der Alkoholreste wiederholt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit je 65 µl Puffer EB und einer Zentrifugation für 2 Minuten bei 13.000 rpm eluiert.

### 3.2.3.16 Präparative Plasmidpräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden präparative Plasmidpräparationen durchgeführt. Es wurden sowohl chemisch kompetente Zellen, TOP10F', als auch elektrokompente Zellen, *E.coli* „sure“, verwendet. Von der Plasmid-DNA wurde jeweils 0,5 µg eingesetzt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt. Für die Elektroporation wurden elektrokompente Zellen, *E.coli* „sure“ auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine auf Eis gekühlte Küvette gegeben, die in den Elektroporator gestellt wurde. Mit den Einstellungen V = 2500, C = 0025, R = 0201 und T = 0005, Imp = 0264,281 K, Pulse = 0004.900 ms wurde die Probe elektroporiert. Sofort danach wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben, die Probe wurde in ein 1,5-ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl dieses Ansatzes

auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Plasmidpräparation wurde am nächsten Tag eine der Bakterienkolonien in 200 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben, der Ansatz kräftig gemischt und auf einen Filter aufgetragen. Mithilfe eines Stempels wurde dann die gesamte Flüssigkeit durch den Filter auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule gedrückt. Es wurden zweimal je 30 ml Puffer QC zum Waschen aufgetragen und anschließend mit 15 ml Puffer QF eluiert. Dabei wurde die Probe in einem Corex-Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit 10,5 ml Isopropanol gemischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 rpm wurde die Plasmid-DNA präzipitiert und danach mit 15 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung bei RT wurde die Plasmid-DNA in 400 µl TE-Puffer resuspendiert und zur Erhöhung der Löslichkeit für 10 min bei 68 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

### **3.2.3.17 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA**

Um festzustellen, welche der Plasmidpräparationen Inserts enthalten, wurden ein DNA-Verdau durchgeführt. Der Vektor pCR2.1 enthält Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoRI*. Es wurden je 4 µl der Plasmidpräparation verwendet. Dazu wurden je 1 µl Puffer React 3, 0, 5 µl Enzym und 4,5 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde der gesamte Verdau mit 2,5 µl 5-fach Auftragspuffer versetzt und auf einem 1,2 % Agarosegel analysiert.

### **3.2.3.18 Kolonie-PCR**

Zusätzlich zu den Plasmidpräparationen wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Hierzu wurden 96-well PCR-Platten und 96-well Mikrotiterplatten verwendet. Die PCR-Platten wurden mit je 100 µl H<sub>2</sub>O befüllt, die Mikrotiterplatten mit je 300 µl

LB/Kanamycin-Medium. Die Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und zuerst in das H<sub>2</sub>O, danach in das Medium gegeben. Es wurde jeweils dieselbe Kavität der PCR-Platte und der Mediumplatte gewählt, sodass gegebenenfalls auf diese Platte für eine weitere analytische Plasmidpräparation zurückgegriffen werden konnte.

Die PCR-Platte mit den Bakterien in H<sub>2</sub>O wurde im Thermocycler für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Dabei wurden die Bakterien soweit zerstört, dass ihre DNA freigesetzt wurde. Anschließend wurden je 2 µl dieser Bakteriensuspension in eine PCR eingesetzt. Für diese PCR wurde ein M13-Primerpaar verwendet, da der Vektor pCR2.1 M13-Bindestellen hat, die das Insert flankieren.

Pipettierschema Kolonie-PCR:

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| 39 µl H <sub>2</sub> O |               |
| 5 µl 10 x Puffer       | PCR-Programm: |
| 1,5 µl dNTP-Mix        | 95 °C/2 min   |
| 2 µl M13-Primer 3´     | 28 Zyklen:    |
| 2 µl M13-Primer 5´     | 95 °C/10 s    |
| 0,5 µl Polymerase      | 60 °C/3 min   |

Je 5 µl der PCR-Produkte wurde auf einem 1,2 % Agarosegel analysiert.

### 3.2.3.19 Reinigung der Nested PCR-Produkte

Vor der Sequenzierung mussten die Produkte aus der Kolonie-PCR gereinigt werden. Hierzu wurden Millipore Platten MANV 030 verwendet. Zu den 52 µl der Kolonie-PCR wurden je 50 µl H<sub>2</sub>O gegeben und der gesamte Ansatz wurde auf eine MANV 030-Platte pipettiert. Unter einem Vakuum von 20 inches wurde für ca. 7 Minuten die gesamte Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurden je 100 µl H<sub>2</sub>O pro Kavität zum Waschen zugegeben und erneut ein Vakuum angelegt. Zum Lösen der gereinigten PCR-Produkte wurden pro Kavität 50 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und die Platte für 5 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Die so in H<sub>2</sub>O gelösten PCR-Produkte wurden mit einer Pipette aufgenommen und in eine saubere PCR-Platte überführt.

### 3.2.3.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit einem ABIPrism™ 3700 durchgeführt. Zuerst wurde eine PCR mit BigDye™ durchgeführt, bei der jeweils 5 µl der Plasmid-Präparation bzw. der PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR eingesetzt wurden. Dazu wurden je 2 µl BigDye™, 1 µl LiChrosolv® H<sub>2</sub>O und 1 µl Primer gegeben. Für die Plasmid-Präparationen wurde ein M13-Primer verwendet, für den die Bindungsstellen auf dem Vektor liegen, während für die Kolonie-PCR ein Nested Primer verwendet wurde, für den die Bindungsstellen auf den Inserts liegen.

PCR-Programm Sequenzierung:

96 °C/1 min

25 Zyklen:

96 °C/10 s

60 °C/4 min

Die PCR-Produkte wurden über Sephadex G-50 gereinigt. Hierzu wurde das Sephadex G-50 Pulver auf eine Millipore HV Platte gegeben, mit je 300 µl H<sub>2</sub>O pro Kavität versetzt und für ca. 3 Stunden quellen gelassen. Danach wurde das Wasser für 5 Minuten bei 2650 rpm abzentrifugiert. Zu den PCR-Produkten wurden je 10 µl LiChrosolv® H<sub>2</sub>O gegeben und der gesamte Ansatz wurde auf die Millipore HV Platte aufgetragen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden für 5 Minuten bei 2650 rpm in eine PCR-Platte abzentrifugiert. Die PCR-Platte wurde mit Aluminium-Klebefolie verschlossen und in den ABIPrism™ 3700 Sequenzierer gesetzt.

### 3.2.3.21 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mithilfe des „BLAST“ Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ausgewertet. Die Sequenzen vor, bzw. nach der *EcoRI* Schnittstelle GAATTC wurden, soweit zu finden, am Anfang und Ende des Inserts markiert und für die Auswertung nicht verwendet.

### 3.2.3.22 Überprüfung der differentiellen Expression

Um zu überprüfen, ob die potentiell exprimierten cDNA's tatsächlich in unterschiedlichen Mengen in den beiden Zellpopulationen vorhanden waren, wurde ein „differential screening“ (PCR-Select Differential Screening Kit, Clontech) durchgeführt. Hierzu wurden die in den Vektor pCR2.1 klonierten PCR-Produkte aus der subtraktiven Hybridisierung („PCR Select“) mit den Primern Nested Primer 1 und Nested Primer 2R amplifiziert.

|  |               |
|--|---------------|
| Pipettierschema Amplifikation Inserts: | PCR-Programm: |
| 1 µl aus Plasmidpräparation            | 94 °C/30 s    |
| 15,27 µl H <sub>2</sub> O              | 23 Zyklen:    |
| 2 µl 10x PCR-Puffer                    | 95 °C/10 s    |
| je 0,6 µl Nested Primer 1 u. 2R        | 68 °C/3 min   |
| 0,4 µl dNTP (10 mM)                    |               |
| 0,13 µl Polymerase                     |               |

Die entstandenen PCR-Produkte wurden gereinigt, mit 1 M NaOH im Verhältnis 1 : 1 gemischt und zu je 2 µl auf GeneScreen Plus Membranen aufgebracht. Die Membranen wurden jeweils in vierfacher Ausführung hergestellt. Die PCR-Produkte wurden in einem UV Stratalinker bei 120 mJ auf der Membran fixiert. Zur Hybridisierung wurden jeweils die subtrahierten Proben und die unsubtrahierten Proben verwendet; für jede der je vier Membranen wurde eine der Proben zur Hybridisierung verwendet. Die subtrahierten und unsubtrahierten Proben wurden in einer PCR mit einem Random-Primer-Mix (Differential Screening Kit) mit <sup>32</sup>P-dCTP eingesetzt. Zuvor wurden die subtrahierten, verdünnten Proben aus der 1. PCR nach Hybridisierung und die unsubtrahierten Proben in einer PCR mit den Primern Nested Primer 1 und Nested Primer 2R amplifiziert.

|                  |                               |               |                |
|------------------|-------------------------------|---------------|----------------|
| Pipettierschema: | 1 µl cDNA                     | PCR-Programm: | 11 Zyklen:     |
|                  | 18,5 µl H <sub>2</sub> O      |               | 94 °C/10 s     |
|                  | 2,5 µl 10x Puffer             |               | 68 °C/30 s     |
|                  | 0,5 µl dNTP (10 mM)           |               | 72 °C/ 1,5 min |
|                  | je 1 µl Nested Primer 1 u. 2R |               |                |

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert (je 8 µl) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Random-Primer-Markierung wurden die PCR-Produkte mit H<sub>2</sub>O gemischt (3 µl PCR-Produkt + 6 µl H<sub>2</sub>O) und für 8 min bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert.

Danach wurde in einer PCR die radioaktive Markierung durchgeführt.

|   |                            |
|---|----------------------------|
| Pipettierschema Random-Primer-Markierung: | 3 µl PCR-Produkt           |
|   | 6 µl H <sub>2</sub> O      |
|   | 3 µl reactionbuffer - dCTP |
|   | 2 µl Random-Primer-Mix     |
|   | 5 µl <sup>32</sup> P-dCTP  |
|   | 1 µl Klenow Enzym          |

Inkubation: 30 min bei 37 °C.

Zur Entfernung der Primer und Nukleotide wurde anschließend das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Es wurden je 100 µl Puffer PB zugegeben und das Gemisch auf eine QIAquick-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm wurde der Durchlauf verworfen, die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 750 µl Puffer PE gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, der Durchlauf verworfen, die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Trockenzentrifugation durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 50 µl Puffer EB. Die Membranen wurden mit je 50 µl 20x SSC und 50 µl Blocking Solution, (die für 5 min bei 95 °C denaturiert worden waren) und 5 ml Hybridization Solution (Clontech) für 60 min bei 72 °C vorhybridisiert (in 50-ml Falconröhrchen). Anschließend wurden die markierten PCR-Produkte mit 50 µl 20x SSC und 50 µl Blocking Solution versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und zu der jeweiligen Membran in der Hybridisierungslösung gegeben. Die Ansätze wurden dann über Nacht bei 72 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die fertig hybridisierten Membranen wurden in auf 68 °C vorgewärmte Waschlösung 2 und Waschlösung 1 gewaschen. Viermal je 20 min in Waschlösung 1 und zweimal je 20 min in Waschlösung 2 (Volumen je 15 ml). Danach wurden die Membranen aus den Reaktionsgefäßen entfernt, auf Whatman-Papier getrocknet und mit Frischhalte-Folie abgedeckt, in einer Röntgenfilmkassette befestigt. Zur Detektion der Radioaktivität wurde ein Röntgenfilm verwendet, der für 24 h exponiert und anschließend entwickelt wurde.

### 3.2.4 Real-time PCR

#### 3.2.4.1 TaqMan™-Analysen

Für eine genauere Untersuchung der Expression verschiedener Faktoren wurden quantitative PCR's mit dem ABI7700® (TaqMan™) durchgeführt. Es wurde hierzu der Farbstoff „SYBR® Green“ verwendet, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und Fluoreszenzsignale aussendet, sobald er nicht mehr frei sondern gebunden vorliegt. Die Stärke der Expression der Faktoren wurde relativ zur Expression einer endogenen Kontrolle, des "housekeeping"-Genes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*G3PDH*) berechnet. Es wurde das  $\Delta\Delta C_t$ -Verfahren angewendet (siehe Abb. 3.5), bei dem zuerst für das Zielgen und die endogene Kontrolle der "threshold cycle" ( $C_t$ ) bestimmt wird. Der  $C_t$  ist der Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal, das aus der Amplifikation des jeweiligen Produktes entsteht, das Fluoreszenzsignal der "baseline", also des Hintergrundrauschens übersteigt. Anschließend wird aus dem  $C_t$  für das Zielgen und dem  $C_t$  für die endogene Kontrolle der  $\Delta C_t$  berechnet. Dann erfolgt die Normalisierung auf den „Kalibrator“ (andere Zellpopulation/"Tag 0"). Hieraus wird der  $\Delta\Delta C_t$  berechnet, der in folgende Formel eingesetzt wird;  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  woraus sich die Expressionsstärke des untersuchten Faktors ergibt.

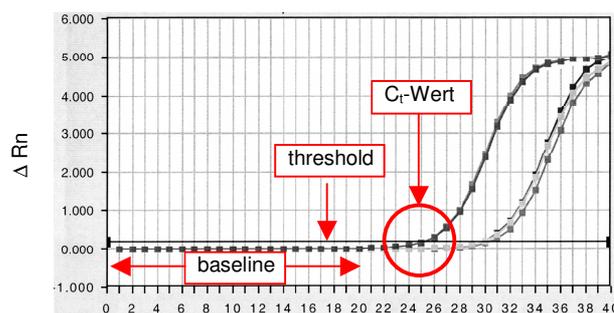


Abb. 3.5: TaqMan Diagramm.

Berechnung  $\Delta\Delta C_t$ :

Normalisierung auf die endogene Kontrolle  
 $C_t$  Zielgen -  $C_t$  endogene Kontrolle ( $\Delta C_t$ )

Normalisierung auf den Kalibrator  
 $\Delta C_t$  Probe -  $\Delta C_t$  Kalibrator ( $\Delta\Delta C_t$ )

Berechnung des Ergebnisses mit  
 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

### 3.2.4.2 Erstellung von Schmelzkurven

Hierzu wurden die Proben im Anschluss an die Durchführung der Real-Time PCR untersucht. Es wurde eine Messung mithilfe der Software SDS v1.7 (Applied Biosystems) nach folgendem Programm durchgeführt:

95 °C/15 s, 60 °C/20 s, 95 °C/15 s.

Über eine Zeit von 19:59 Minuten wurden die Fluoreszenzdaten erfasst, die bei der Temperaturerhöhung von 60 °C auf 95 °C gemessen wurden (ramp time = 19:59).

Bei der Aufnahme der Schmelzkurve wird die DNA also nach einem kurzen Denaturierungsschritt bei 95 °C auf 60 °C abgekühlt und anschließend über 20 Minuten in kleinen Schritten wieder auf 95 °C erhitzt („geschmolzen“). Da der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green nur dann Fluoreszenz emittiert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist, ist eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen, wenn sich die Doppelstränge bei steigender Temperatur trennen.

Nach Beendigung der Datenaufnahme wurden die Daten analysiert und als „multicomponent file“ gespeichert. Die Darstellung als Schmelzkurve erfolgte mithilfe der ABI Prism<sup>®</sup> 7700 „Dissociation Curves 1.0“ Software und dem „Graphic Converter“. Nach Öffnen der „multicomponent“-Daten erstellt die Software automatisch einen Graphen der Dissoziations-Kurve. Die x-Achse zeigt die Temperatur und die y-Achse zeigt die Ableitung/Funktion der Fluoreszenz (-dF/dT).

Abbildung 3.6 zeigt eine Schmelzkurve für eine Amplifikation, bei der keine Nebenprodukte oder Primer-Dimere vorhanden sind. Nach jeder Real-Time PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei Vorhandensein von Nebenprodukten oder Primer-Dimeren wurden die Daten nicht zur weiteren Auswertung verwendet.

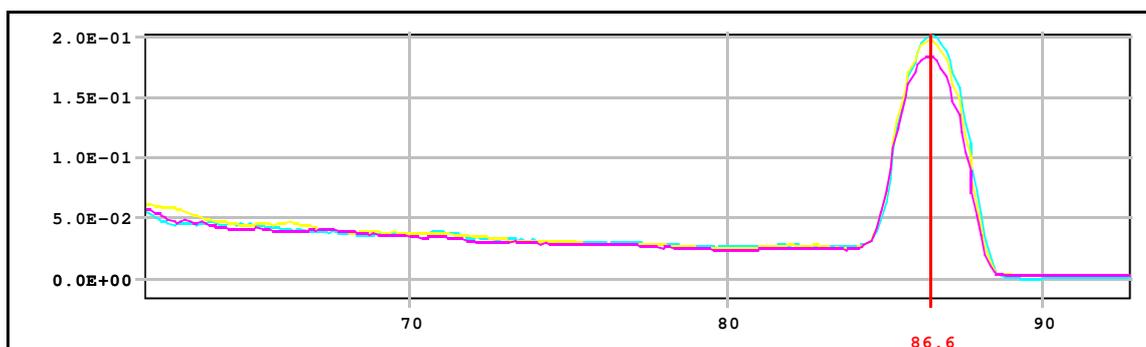


Abb. 3.6: Schmelzkurve für eine Amplifikation ohne Nebenprodukte oder Primer-Dimere.

### 3.2.5 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) bietet die Möglichkeit, für bestimmte DNA-Abschnitte die Chromatinstruktur zu ermitteln. Bereiche der DNA, die nicht transkribiert werden, sind durch ihre Chromatinstruktur gekennzeichnet; durch Methylierung der Cysteinreste oder durch Acetylierung der Histone. Eine Methylierung führt dabei zu einer Stilllegung, während es bei der Acetylierung umgekehrt ist. Für ChIP Analysen stehen sowohl Antikörper zur Verfügung, die methylierte DNA erkennen, als auch Antikörper, die Histonacetylierungen detektieren. Diese Antikörper werden in fragmentierte DNA-Präparationen eingesetzt und präzipitieren dann DNA-Abschnitte, die methyliert sind bzw. acetylierte Histone aufweisen. Die so erhaltenen DNA-Fragmente können dann nach Entfernen der übrigen DNA in PCR-Analysen eingesetzt werden, wobei spezifische Primer für die zu untersuchenden Gene verwendet werden. So kann ermittelt werden, ob der jeweils amplifizierte DNA-Abschnitt eine „offene“ oder „geschlossene“ Chromatinstruktur besitzt, d.h. ob in diesem Bereich eine Methylierung oder eine Histonacetylierung besteht oder nicht.

#### 3.2.5.1 Durchführung der ChIP-Experimente

Für die ChIP-Experimente wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen im jeweiligen Medium (in 1,5 ml Falconröhrchen) aufgenommen und zum Fixieren der DNA-bindenden Proteine an die DNA wurde 37%iges Formaldehyd zu 1 % zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert und zweimal in kaltem PBS mit Proteinaseinhibitoren (Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF 1 mM; Aprotinin 1 µg/ml, Pepstatin A 1 µg/ml) gewaschen. Anschließend wurde für 5 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in Lysispuffer bei RT resuspendiert und das Lysat für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Scherung der DNA (ebenfalls auf Eis) mithilfe einer 2 mm Mikrosonde des Ultraschall Desintegrator 130W auf Fragmente von 300 bp bis 1,5 kb, wobei 6 mal für je 10 Sekunden mit 30 % maximaler Amplitude sonifiziert wurde. Für die Antikörperpräzipitation wurde die gescherte DNA für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt.

Anschließend wurden 10x ChIP Dilutionpuffer und Proteinaseinhibitoren zugegeben. Von dieser unpräzipitierten Probe wurden 120 µl als "input" für die später erfolgende Real-time PCR zurückbehalten. Zu den zu präzipitierenden Proben wurden je 70 µl Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose (50 %) gegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend für 2 min bei 1900 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und die jeweiligen Antikörper in folgenden Mengen zugegeben:

Rabbit IgG (als Isotypkontrolle) 2,5 µg

Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8) 5 µg

Anti-dimethyl-Histon H3 (K9) 5 µg

Anti-PLZF 2 µg

Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurden 60 µl Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose zugegeben und nochmals für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei 1900 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit der nicht präzipitierten DNA verworfen. Das Präzipitat wurde je einmal in jeweils 1 ml Waschpuffer (Low Salt Immune Complex Wash Buffer, High Salt Immune Complex Wash Buffer und anschließend LiCl Immune Complex Wash Buffer) und zweimal in TE-Puffer gewaschen.

Für die folgenden PCR oder Real-time PCR-Experimente wurden die Proben mit 250 µl Elutionspuffer (1 % SDS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) versetzt und für 15 min bei RT in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2000 rpm und RT wurde der Überstand in ein frische Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 20 µl 5 M NaCl zugegeben und die Proben für 4 h bei 65 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 10 µl EDTA, 0,5 M, 20 µl Tris-HCl, 1 M, pH 6,5 und 2 µl Proteinase K, 10 mg/ml zugegeben und für 1 h bei 45 °C in einem Heizblock inkubiert. Zur abschließenden Reinigung wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Die Proben wurden 5-fach mit Puffer PB versetzt, durch Invertieren gemischt und auf eine QIAquick-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. Es wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen, für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und zum Trocknen der Membran erneut ohne Waschpuffer für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl Puffer EB in ein frisches Reaktionsgefäß und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.

### 3.2.5.2 Klonierung der präzipitierten DNA aus den ChIP-Experimenten

Zur Identifizierung der Bindungsstelle von Proteinen auf der DNA kann die DNA nach einem ChIP-Experiment in einen Vektor kloniert und sequenziert werden.

Die mittels ChIP-Methode präzipitierte DNA wurde mit RNase A behandelt (Endkonzentration 10 µg/ml) und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Nach Zugabe von T4-DNA-Polymerase wurde für 20 min bei 12 °C inkubiert und die DNA wieder mit QIAquick gereinigt. Die Elution erfolgte mit H<sub>2</sub>O. Danach wurde eine Taq-DNA-Polymerase zugegeben, für 20 min bei 72 °C inkubiert und die entstandenen PCR-Produkte mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1 kloniert. Nach Transfektion in *E.coli* TOP10F' wurden analytische Plasmidpräparationen durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA mithilfe eines M13-Primers sequenziert.

### 3.2.6 Transfektion von humanen Zellen

#### 3.2.6.1 Vektor pcDNA/PLZF(2,1)

Zur Überexpression von PLZF in NK-Zelllinien und NK-Zellen wurde der Vektor pcDNA/PLZF(2,1) (zur Verfügung gestellt von Dr. Birgit Gellersen, Endokrinologikum Hamburg) verwendet. Es handelt sich um den Vektor pcDNA3.1(+) (Abbildung 3.7), in dessen *HindIII/BamHI*-Stellen der multiple cloning site (MCS) die kodierende Region des humanen PLZF mit 65 bp 5'-UTR und 34 bp 3'-UTR kloniert wurde.

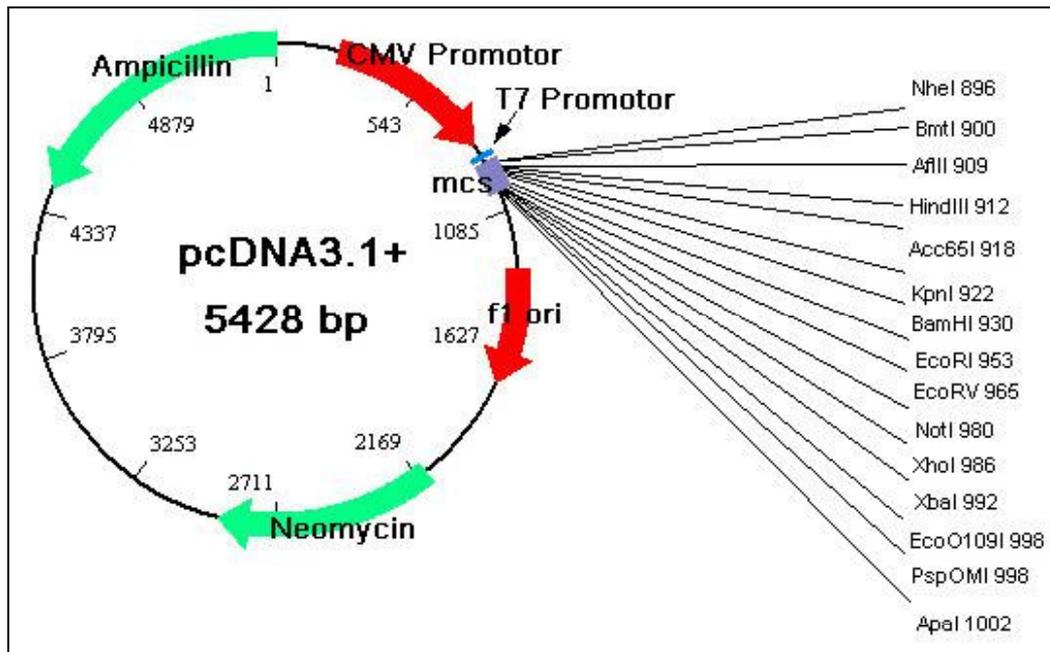


Abb. 3.7: Vektorkarte für pcDNA3.1.

### 3.2.6.2 Nukleofektion™

Die Transfektion von humanen Zellen wurde mit dem Nucleofektor von Amaxa durchgeführt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, für 7 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und in 90 µl Puffer pro 5 Millionen Zellen resuspendiert. Es wurden je 5 µg DNA pro 5 Millionen Zellen eingesetzt. In 1,5-ml Reaktionsgefäßen wurde die DNA mit 5 µg vorgelegt und die Zellsuspension zugegeben, gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Diese wurde in den Nucleofektor gesetzt und mit dem Programm „U-01“ wurden die Zellen nukleofiziert. Anschließend wurden 500 µl Medium zugegeben und die nukleofizierten Zellen mithilfe von Micro-Pasteurpipetten in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Danach erfolgte die Kultivierung in 6-well Platten bei 37 °C.

### **3.2.7 Proteinchemische Methoden**

#### **3.2.7.1 Proteinisolierung**

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden die Zellen zuerst für 7 min bei 1500 rpm und 10 °C zentrifugiert und anschließend in PBS gewaschen. Das Präzipitat wurde dann in eiskaltem Lysispuffer (mit Proteinaseinhibitoren) resuspendiert. Zur Weiterverarbeitung wurde eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand, der das Gesamtprotein enthielt, vorsichtig abpipettiert und zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die Lagerung der Proteinlysate fand bei -20 °C statt.

#### **3.2.7.2 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Protein Assay von BioRad durchgeführt. Es wurden je 25 µl der Lösung A', die zuvor mit 2 µl Lösung S pro 100 µl Lösung A versetzt worden waren, zu 5 µl Proteinlysate gegeben. Nach Zugabe von je 200 µl Lösung B wurde vorsichtig gemischt und die Proben 15 min bei RT inkubiert. Als Standardreihe wurden BSA-Lösungen von 0,2 bis 1,4 mg/ml verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte im Photometer bei 750 nm. Anschließend wurde eine Standardkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden konnte.

#### **3.2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Gesamtproteinlysate wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970) durchgeführt. Aus 30 % Acrylamid, Tris-HCl-Puffer, H<sub>2</sub>O, 10 % SDS, 10 % APS und TEMED in unterschiedlicher Mischung wurden das Trenngel und das Sammelgel hergestellt. Der 10x Elektrodenpuffer wurde mit H<sub>2</sub>O zu 1x Elektrodenpuffer verdünnt. Als Auftragspuffer wurde der 5x AP (reduzierend) von BioRad verwendet. Als Marker wurden je 10 µl des Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range von BioRad

verwendet. Vor dem Auftragen wurden die mit AP versetzten Proben für 5 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 - 35 mA für 1 - 2 h. Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele entweder mit Coomassie gefärbt (je 1-2 h in Lösung 1 und 2, anschließend 2 h in Lösung 3) oder direkt für einen Western Blot weiterverwendet.

Trenngel 10 %:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| 30 % Acrylamid     | 1,67 ml |
| 1 M Tris-HCl (8,8) | 1,88 ml |
| H <sub>2</sub> O   | 1,36 ml |
| 10 % SDS           | 50 µl   |
| 10 % APS           | 40 µl   |
| TEMED              | 4 µl    |

Trenngel 12 %:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| 30 % Acrylamid     | 2,1 ml  |
| 1 M Tris-HCl (8,8) | 1,88 ml |
| H <sub>2</sub> O   | 0,95 ml |
| 10 % SDS           | 50 µl   |
| 10 % APS           | 40 µl   |
| TEMED              | 4 µl    |

Sammelgel 5 %:

|                    |          |
|--------------------|----------|
| 30 % Acrylamid     | 0,333 ml |
| 1 M Tris-HCl (6,8) | 0,25 ml  |
| H <sub>2</sub> O   | 1,39 ml  |
| 10 % SDS           | 20 µl    |
| 10 % APS           | 10 µl    |
| TEMED              | 2 µl     |

Sammelgel 7,5 %:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| 30 % Acrylamid     | 1,25 ml |
| 1 M Tris-HCl (6,8) | 1,88 ml |
| H <sub>2</sub> O   | 1,78 ml |
| 10 % SDS           | 50 µl   |
| 10 % APS           | 40 µl   |
| TEMED              | 4 µl    |

### 3.2.7.4 Western Blot

Für den Proteintransfer wurde die "Semi-dry" Kammer von BioRad verwendet. Das Polyacrylamidgel wurde zusammen mit den auf die Gelgröße zugeschnittenen Whatman-Papieren und der Nitrocellulosemembran in 1-fach WB-Puffer kurz inkubiert. Danach wurden zuerst einige Whatman-Papiere, dann die Nitrocellulosemembran, darauf das Polyacrylamidgel und abschließend wieder einige Whatman-Papiere auf die untere Elektrode der Kammer gestapelt. Eventuell entstandene Luftblasen wurden hierbei entfernt. Der Transfer erfolgte bei 15 V für 1h. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran kurz in Ponceau-Lösung inkubiert, um die übertragenen Proteine sichtbar zu machen. Anschließend wurde die Lösung durch zweimaliges Waschen mit PBS für je ca. 5 min wieder entfernt.

Das Absättigen der nicht mit Protein besetzten Stellen auf der Membran erfolgte durch Inkubation mit 5 % Magermilch in PBS für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Vor der Verwendung des Erstantikörpers wurde die Membran dreimal für je 5 min in PBS + 0,1 % TW-20 gewaschen. Der Erstantikörper wurde zu 2 µg/ml in 1 % Magermilch in PBS verdünnt und die Membran darin für 1 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal für je 5 min in PBS + 0,1 % TW-20 gewaschen und die Membran danach mit dem 1 : 1000 in 1 % PBS verdünnten Zweitantikörper für 1 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach letztmaligem Waschen (3x 5 min in PBS + 0,1 % TW-20) wurde die Detektion mit dem ECL™ Kit von Amersham durchgeführt. Es wurden je 5 - 7 ml der Reagentien 1 und 2 im gleichen Verhältnis gemischt und anschließend auf die Oberseite der Membran gegeben. Mit dieser Mischung wurde die Membran für 1 min bei RT inkubiert und anschließend auf Zellstofftüchern leicht getrocknet. Danach wurde die Membran zwischen Klarsichtfolie in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Der Röntgenfilm wurde für 30 s bis 2 min exponiert und anschließend entwickelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 NK3.3- und Jurkat-Zellen

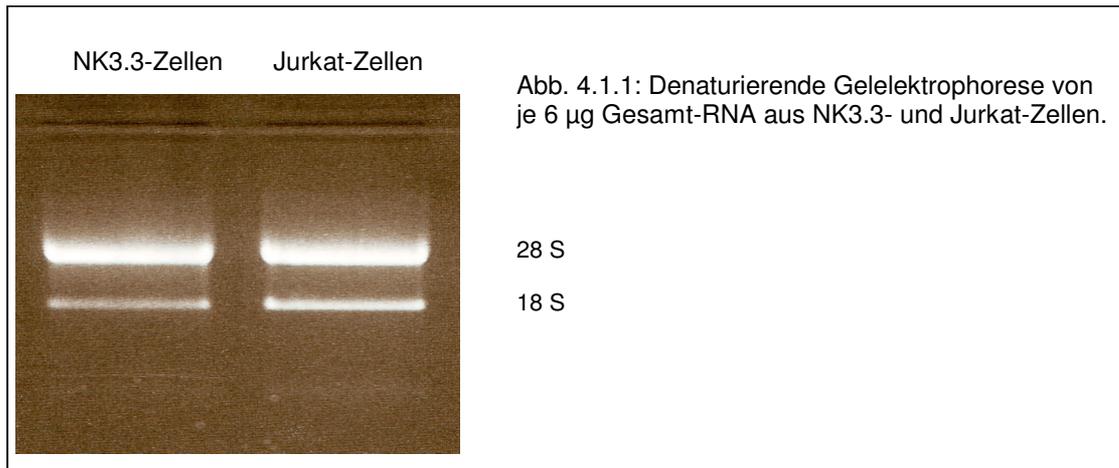
Als typische Zelllinien, die in vielen Experimenten zur Untersuchung von NK- bzw. T-Zellen verwendet werden, dienen häufig NK3.3- und Jurkat-Zellen. Da diese Zelllinien immortalisiert und klonal sind, stehen sie zum einen jederzeit in gewünschter Menge zur Verfügung und zum anderen müssen nicht, wie z.B. bei primären NK-Zellen, spenderabhängige Unterschiede berücksichtigt werden.

Aus diesen beiden Zelllinien sollten mithilfe der PCR-Select<sup>TM</sup>-Methode (Clontech) subtraktive cDNA-Banken hergestellt werden. Hierdurch sollten ihre Expressionsprofile vergleichbar dargestellt werden, um zu ermitteln, welche NK- bzw. T-Zelltypischen Gene exprimiert werden, was für die Verwendung beider Zelllinien in NK- und T-Zell-relevanten Experimenten von Bedeutung ist.

#### 4.1.1 RNA-Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus NK3.3- und Jurkat-Zellen wurde eine Zentrifugation mit Cäsium-Chlorid-Gradient durchgeführt. Anschließend wurde mithilfe einer denaturierenden Gelelektrophorese die Integrität der Gesamt-RNA überprüft.

Die analytische Agarosegelelektrophorese (Abb. 4.1.1) zeigt die beiden für intakte RNA zu erwartenden Banden der eukaryotischen ribosomalen 18S und 28S RNA bei 1,9 und 4,5 kb. Die isolierte RNA ist somit intakt, ebenfalls kann eine Kontamination mit DNA ausgeschlossen werden, da im Bereich über der 28S-Bande keine weiteren Banden zu sehen sind, die durch genomische DNA verursacht würden.



#### 4.1.2 mRNA-Isolierung

Aufgrund der hohen Ausbeute an Gesamt-RNA aus NK3.3- und Jurkat-Zellen konnte als Ausgangsmaterial für die PCR-Select™ cDNA-Bank mRNA eingesetzt werden. Bei den übrigen cDNA-Banken wurde Gesamt-RNA verwendet. Die mRNA wurde mithilfe des Oligotex Kit (Qiagen) aus der Gesamt-RNA isoliert, wobei je 250 µl Gesamt-RNA von NK3.3- und Jurkat-Zellen verwendet wurden. Die Ausbeute betrug für die NK3.3-Zellen 3,3 µg mRNA und für die Jurkat-Zellen 3,2 µg mRNA.

#### 4.1.3 cDNA-Synthese

Die Erststrang-cDNA-Synthese für die PCR-Select™ cDNA-Bank wurde mit jeweils 2 µg mRNA unter Verwendung einer AMV Reversen Transkriptase und des cDNA-Primers (beides PCR-Select™) durchgeführt. Das Erststrangprodukt wurde direkt anschließend komplett in die Zweitstrangsynthese eingesetzt, die mit einem Zweitstrang-Enzym-Cocktail (PCR-Select™) und anschließender Zugabe von T4-DNA-Polymerase (PCR-Select™) durchgeführt wurde. Als Kontrolle für die Durchführung der Subtraktion wurde gleichzeitig mit den Proben für NK3.3- und Jurkat-Zellen eine „control PolyA<sup>+</sup>-RNA“ (PCR-Select™) verarbeitet. Hiervon wurden ebenfalls 2 µg für die cDNA-Synthese verwendet.

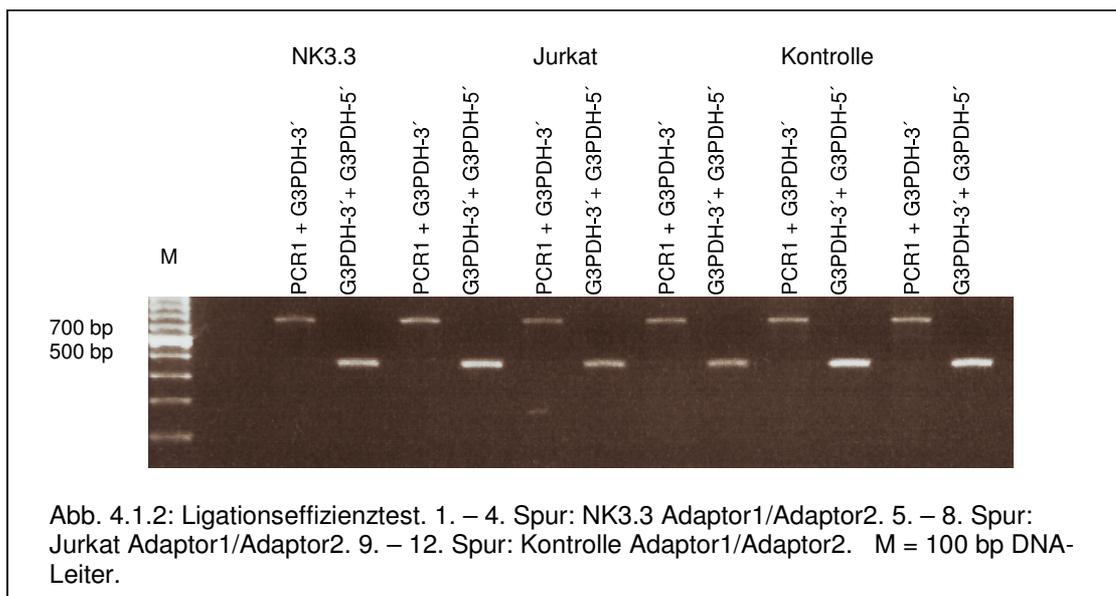
#### 4.1.4 Restriktionsverdau mit *RsaI*

Um an der cDNA die passenden Enden für die spätere Adaptorligation zu schaffen, musste ein Restriktionsverdau mit *RsaI* durchgeführt werden. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese zur Kontrolle des Restriktionsverdaus durchgeführt.

Für die unverdaute cDNA wurde ein Schmier von 10 kb bis 500 bp erwartet, für die verdaute cDNA von 2 kb bis 100 bp. Dass der Restriktionsverdau erfolgreich durchgeführt wurde, zeigte sich durch das Vorhandensein eines cDNA-Schmiers zwischen ca. 1,5 kb und 100 bp, während die unverdaute cDNA im Bereich zwischen 10 kb und 500 bp lag.

#### 4.1.5 Ligationseffizienztest

Zur Überprüfung der Effizienz der Adaptorligation wurde eine PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, wobei eines der Primerpaare (*G3PDH-3'* und Primer 1) nur dann ein Produkt ergibt, wenn das cDNA-Molekül, an das sich der Primer anlagert, mit einem Adaptor verknüpft ist. Hierbei entsteht ein PCR-Produkt von 750 kb, während durch das andere Primerpaar (*G3PDH-3'* und *G3PDH-5'*) ein Produkt von 450 kb entsteht. Durch die Intensität der beiden Banden kann auf die Effizienz der Adaptorligation geschlossen werden; mindestens 25 % der cDNA sind mit Adaptoren versehen, wenn die Intensität der 750 kb-Bande mehr als  $\frac{1}{4}$  der Intensität der 450 kb-Bande aufweist. Die Abbildung 4.1.2 zeigt die PCR-Produkte, analysiert auf einem Agarosegel. Sowohl die 450 kb als auch die 750 kb-Bande sind vorhanden; die Intensität der 450 kb-Bande ist etwas mehr als doppelt so hoch wie die Intensität der 750 kb-Bande, was eine ausreichende Effizienz der Adaptorligation beweist.



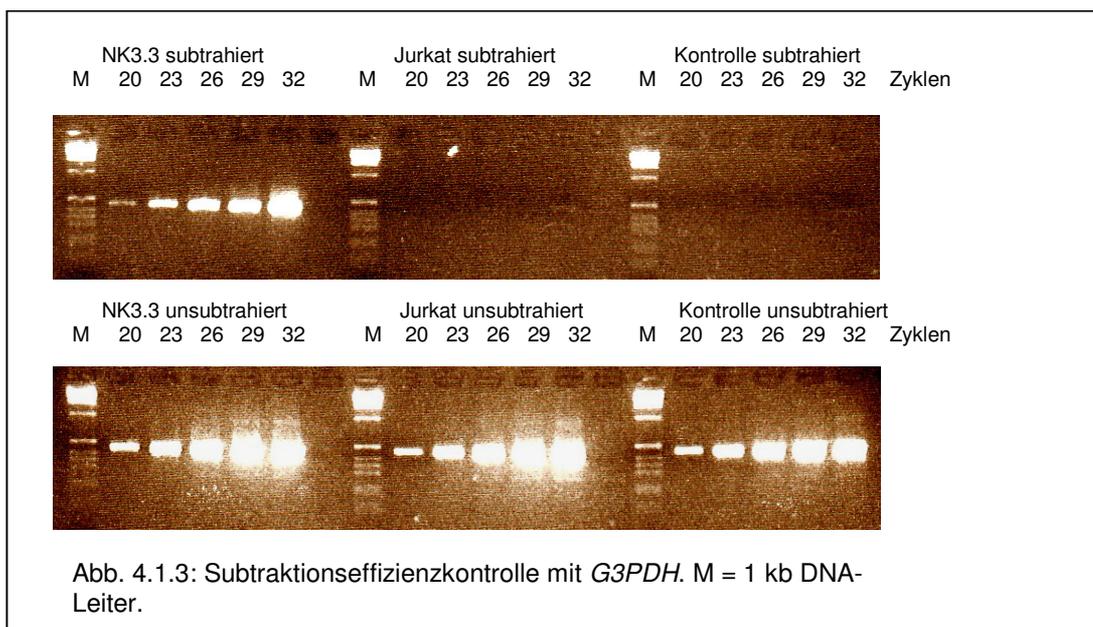
#### 4.1.6 Subtraktionseffizienztest

Proben des PCR-Produkts nach der ersten Hybridisierung wurden zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Vor der Subtraktion waren zu einem Teil der Kontrolle  $\phi$ X174/*Haell*III-Fragmente zugegeben worden, die nach der Subtraktion als "differentiell exprimierte Sequenzen" in der Kontrolle zurückbleiben sollten. Neben den  $\phi$ X174/*Haell*III-Fragmenten in der subtrahierten Kontrolle wird bei erfolgreicher Subtraktion in den übrigen Proben ein Schmier zwischen 0,2 und 2 kb erwartet.

Da der gesamte Hybridisierungsansatz vor der PCR in 200  $\mu$ l dilution buffer verdünnt worden und für die PCR nach Anleitung PCR-Select<sup>TM</sup> je 1  $\mu$ l daraus eingesetzt worden war, waren die empfohlenen PCR-Bedingungen mit 27 Zyklen für die 1. PCR und 12 Zyklen für die 2. PCR nicht ideal, um die PCR auf einem Agarosegel zu analysieren und zu dokumentieren, d.h. die DNA-Konzentrationen waren dafür zu gering. Es konnte aber davon ausgegangen werden, dass die Produkte amplifiziert worden waren, da zum Einen die kontrollsubtrahierte Probe sowie die unsubtrahierten Proben mit dem zu erwartenden Ergebnis amplifiziert worden und auf dem Agarosegel zu sehen waren und zum Anderen eine photometrische Konzentrationsbestimmung des PCR-Produktes für alle Proben die gleiche cDNA-Menge ergab. Aufgrund dessen wurde mit der Subtraktionseffizienzkontrolle (mit *G3PDH*) fortgefahren.

#### 4.1.7 Subtraktionseffizienzkontrolle mit *G3PDH*

Zur Überprüfung der Effizienz der Subtraktion wurden die subtrahierten und unsubtrahierten Proben in eine semiquantitative PCR mit *G3PDH*-Primern eingesetzt, d.h. es wurde nach 20, 23, 26, 29 und 32 Zyklen PCR-Produkt entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Die Abbildung 4.1.3 zeigt, dass das *G3PDH*-Transkript in den subtrahierten Proben zurückgegangen ist und die deutliche Bande, die bei NK3.3 frühestens bei 23 Zyklen zu sehen ist, bei der unsubtrahierten Probe schon bei 20 Zyklen erscheint. Bei Jurkat und bei der Kontrolle ist *G3PDH* durch die Subtraktion so weit entfernt worden, dass eine Bande hier erst bei 32 Zyklen und auch nur sehr schwach zu sehen ist, obwohl *G3PDH* vor der Subtraktion in großer Menge vorhanden war, wie die deutlichen Banden bei 20 Zyklen zeigen.



#### 4.1.8 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene

Die Inserts der positiven Klone wurden über Plasmidpräparationen isoliert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen wurden mithilfe des BLAST-Programms analysiert und die Ergebnisse in Tabellen zusammengefasst.

Für NK3.3-Zellen wurden 314 Inserts sequenziert, von denen 235 ausgewertet werden konnten. Diese sind 129 verschiedenen bereits beschriebenen Genen mit insgesamt 135 verschiedenen Genbanknummern zuzuordnen. Für Jurkat-Zellen wurden 118 Inserts sequenziert, von denen 69 ausgewertet werden konnten. Diese 69 Sequenzen verteilen sich auf 41 verschiedene Gene mit insgesamt 45 verschiedenen Genbankeinträgen.

In den Listen ist die Häufigkeit vermerkt, mit der die jeweilige Sequenz in der cDNA-Bank vorkommt, des Weiteren das jeweilige Symbol für das Gen (Gensymbol), die Accession Number (Acc.No.), eine Kombination aus Buchstaben und Ziffern, die als eindeutiger Zugriffsschlüssel in der Genomdatenbank dient, sowie eine Klassifizierung des jeweiligen Gens, die sich nach der Funktion des Genproduktes richtet.

Tab. 4.1.1: In NK3.3-Zellen differentiell exprimierte Sequenzen.

| Häufigkeit | Gensymbol      | Acc. No.    | Klassifizierung            |
|------------|----------------|-------------|----------------------------|
| 2          | FTL            | NM_000146.3 | (Eisen-)Stoffwechsel       |
| 2          | FTL            | XM_050469.1 | (Eisen-)Stoffwechsel       |
| 3          | B2M            | NM_004048.1 | Antigenpräsentation        |
| 2          | IFI44          | XM_001628.1 | Antivirale Immunantwort    |
| 1          | IFI78          | BC032602.1  | Antivirale Immunantwort    |
| 1          | ELMOD2         | BC105283    | Apoptose                   |
| 3          | PRG1           | XM_005980.4 | Apoptose                   |
| 1          | CFLAR          | XM_027966.1 | Apoptose                   |
| 2          | CASP4          | XM_040763.1 | Apoptose                   |
| 1          | STK10          | AF119894.1  | Enzym                      |
| 1          | APOBEC3C       | BC011739.1  | Enzym                      |
| 1          | CYP1B1         | XM_002576.3 | Enzym                      |
| 3          | AOAH           | XM_004853.3 | Enzym                      |
| 1          | LOC51144       | XM_006300.4 | Enzym                      |
| 1          | TXNRD1         | XM_015673.2 | Enzym                      |
| 3          | FUCA1          | XM_032317.1 | Enzym                      |
| 1          | PRDX1          | XM_032395.1 | Enzym                      |
| 2          | IMPA1          | XM_044997.1 | Enzym                      |
| 1          | GLUL           | XM_046469.1 | Enzym                      |
| 1          | IMAGE: 4120469 | BC009316    | Enzym (NADH Dehydrogenase) |
| 1          | SNF1LK         | AP001696.1  | Enzym/Proteinkinase        |

|    |                  |             |                                   |
|----|------------------|-------------|-----------------------------------|
| 4  | HLA              | BC001023.1  | HLA                               |
| 3  | HLA II DR beta 4 | BC005312.1  | HLA                               |
| 1  | HLA-C            | BC010542.1  | HLA                               |
| 1  | HLA-DR           | K01171.1    | HLA                               |
| 1  | HLA              | M24096.1    | HLA                               |
| 3  | HLA-DR           | M60334.1    | HLA                               |
| 14 | HLA              | NM_019111.1 | HLA                               |
| 2  | HLA              | V00523.1    | HLA                               |
| 5  | HLA              | X02902.1    | HLA                               |
| 3  | HLA              | XM_004209.3 | HLA                               |
| 1  | HLA              | XM_004220.4 | HLA                               |
| 1  | HLA              | XM_029693.1 | HLA                               |
| 2  | HLA              | XM_042473.1 | HLA                               |
| 1  | HLA              | X02902.1    | HLA                               |
| 6  | HLA              | XM_045209.1 | HLA                               |
| 7  | HLA              | XM_045210.1 | HLA                               |
| 1  | HLA              | XM_045212.1 | HLA                               |
| 5  | HLA              | XM_045222.1 | HLA                               |
| 1  | FLJ23277         | NM_032236.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | MGC10540         | NM_032353.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | DJ434O14.3       | XM_015887.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | LOC90275         | XM_030499.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | FLJ14393         | XM_030801.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | LOC90619         | XM_032985.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | LOC90755         | XM_033918.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | FLJ10206         | XM_036574.1 | Hypothetisches Protein            |
| 5  | LOC91460         | XM_038574.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | LOC92063         | XM_042560.1 | Hypothetisches Protein            |
| 1  | LOC92241         | XM_043776.1 | Hypothetisches Protein            |
| 3  | <b>CD74</b>      | M13560.1    | Membranprotein                    |
| 2  | PRG1             | NM_002727.1 | Membranprotein                    |
| 1  | <b>CD96</b>      | NM_005816.1 | Membranprotein                    |
| 9  | <b>CD74</b>      | XM_003937.2 | Membranprotein                    |
| 3  | CD70             | XM_009014.2 | Membranprotein                    |
| 1  | ZDHC14           | NM_024630.2 | Membranprotein                    |
| 1  | HSPC078          | AF161341    | Membranprotein                    |
| 1  | TEMEM66          | XM_047129.1 | Membranprotein                    |
| 1  | IL2RG            | XM_047675.1 | Membranprotein                    |
| 1  | CD48             | XM_049704.1 | Membranprotein                    |
| 3  | <b>CD39</b>      | XM_051048.1 | Membranprotein                    |
| 1  | SLAMF7           | AB027233.1  | Membranprotein                    |
| 1  | <b>CD74</b>      | XM_042002.1 | Membranprotein/Signaltransduktion |
| 2  | TOMM7            | NM_019059   | Mitochondrium                     |
| 1  | HAX1             | XM_036842.1 | Mitochondrium                     |
| 1  | HN               | AY029066.1  | Neuroprotektiver Faktor           |
| 2  | MDS003           | XM_008680.4 | Protein-Prozessierung             |
| 1  | GORASP2          | XM_027772.1 | Protein-Prozessierung             |
| 2  | NIBAN            | XM_051865.1 | Protein-Prozessierung             |
| 1  | ARF1             | BC011358.1  | Proteintransport                  |
| 1  | FBXL6            | XM_016292.2 | Proteolyse                        |
| 1  | RRM2B            | XM_042094.1 | Replikation/DNA-Reparatur         |
| 1  | HERV-K10         | AB025306.1  | Retroposon                        |
| 1  | F2R              | AF391809.2  | Rezeptor                          |

|   |                   |             |                                |
|---|-------------------|-------------|--------------------------------|
| 1 | MCHR2             | AL590725.5  | Rezeptor                       |
| 1 | SORL1             | AP000977.4  | Rezeptor                       |
| 3 | SELL              | M25280.1    | Rezeptor                       |
| 1 | <b>KIR2DL3</b>    | NM_014511.1 | Rezeptor                       |
| 1 | <b>KIR-103AST</b> | U73394.1    | Rezeptor                       |
| 1 | <b>KLRB1</b>      | XM_006630.2 | Rezeptor                       |
| 1 | XRN2              | AL117332.16 | Ribonuklease                   |
| 1 | RPS4Y1            | AF116711.1  | Ribosomales Protein            |
| 2 | RPL13             | NM_000977.2 | Ribosomales Protein            |
| 1 | KIAA1008          | XM_029548.1 | RNA-Prozessierung              |
| 2 | DDX5              | XM_008344.4 | RNA-Prozessierung/RNA-Helicase |
| 2 | HSPC022           | AF077208.1  | Signaltransduktion             |
| 1 | IMPG2             | AF271371.1  | Signaltransduktion             |
| 2 | CAPN2             | BC011828.1  | Signaltransduktion             |
| 1 | HCLS1             | NM_005335.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | LPXN              | XM_006011.4 | Signaltransduktion             |
| 1 | IQGAP1            | XM_007702.4 | Signaltransduktion             |
| 1 | GNB2L1            | XM_028556.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | PTPRC             | XM_036636.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | <b>CD2</b>        | BC033583.1  | Signaltransduktion             |
| 1 | YWHAZ             | XM_042056.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | RGS1              | XM_042967.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | PNRC1             | XM_046716.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | CAPN2             | XM_047251.1 | Signaltransduktion             |
| 1 | SFRS11            | XM_001835.2 | Splicing                       |
| 1 | CCNL1             | AF113016.1  | Transkription                  |
| 1 | TRPC4AP           | AL132825.35 | Transkription                  |
| 1 | NCOA4             | S71225.1    | Transkription                  |
| 1 | MBD2              | XM_042981.1 | Transkription                  |
| 1 | TRA1              | X15187      | Transkription                  |
| 2 | ASH2L             | XM_049420.1 | Transkription                  |
| 2 | TERT              | AF043739.1  | Transkription                  |
| 1 | ZNF236            | AK000847.1  | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | ZNF216            | BC011018.1  | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | Dp-1              | BC011685.1  | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | <b>ITF2</b>       | M74718.1    | Transkriptionsfaktor           |
| 3 | <b>PSCDBP</b>     | NM_004288.2 | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | <b>BHLHB2</b>     | XM_005086.2 | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | HOXB7             | XM_008559.1 | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | TFDP1             | XM_012304.3 | Transkriptionsfaktor           |
| 1 | ZNF216            | XM_038184.1 | Transkriptionsfaktor           |
| 2 | EEF1A1            | BC010735.1  | Translation                    |
| 1 | HRI               | XM_017736.2 | Translation                    |
| 3 | SLC25A6           | BC008737.1  | Transporter/Mitochondrium      |
| 4 | S100A4            | XM_001345.3 | Tumorbildung/Metastasierung    |
| 1 | FLJ20993          | AK024646.1  | Unklassifiziert                |
| 4 | MGC:134704        | BC114377    | Unklassifiziert                |
| 1 | OCIAD1            | BC088361.1  | Unklassifiziert                |
| 1 | VDUP1             | AB051901.1  | Zellzyklus                     |
| 1 | RAD21             | BC001229.1  | Zellzyklus                     |
| 1 | CHEK1             | NM_001274.1 | Zellzyklus                     |
| 1 | RAD21             | NM_006265.1 | Zellzyklus                     |
| 1 | CDKN1A            | XM_011458.3 | Zellzyklus                     |

|   |             |             |                       |
|---|-------------|-------------|-----------------------|
| 1 | CCND2       | XM_034567.1 | Zellzyklus            |
| 2 | CUL1        | XM_027270.1 | Zellzyklus/Proteolyse |
| 1 | CCL1        | NM_002981.1 | Zytokin               |
| 1 | ACTG1       | BC010999.1  | Zytoskelett           |
| 1 | DOCK2       | XM_047961.1 | Zytoskelett           |
| 1 | <b>GZMB</b> | NM_004131.2 | Zytotoxizität         |
| 3 | <b>GNLY</b> | XM_002559.2 | Zytotoxizität         |
| 1 | <b>CTSW</b> | XM_006505.4 | Zytotoxizität         |

Tab. 4.1.2: In Jurkat-Zellen differentiell exprimierte Sequenzen.

| Häufigkeit | Gensymbol   | Acc.-Nr.    | Klassifizierung               |
|------------|-------------|-------------|-------------------------------|
| 1          | HMGCR       | BC033692.1  | Cholesterol Biosynthese       |
| 3          | HMGCS1      | BC083514.1  | Cholesterol Biosynthese       |
| 2          | TA-PP2C     | AK098051.1  | Enzym                         |
| 1          | LDHB        | AY189689.1  | Enzym                         |
| 2          | MAK3        | BC012731.2  | Enzym                         |
| 1          | CHI3L2      | AK223316.1  | Enzym/Hydrolase               |
| 1          | CHI3L2      | BC011460.1  | Enzym/Hydrolase               |
| 1          | CHI3L2      | U58515.1    | Enzym/Hydrolase               |
| 1          | H3F3B       | Z48950.1    | Genexpression                 |
| 1          | C21orf59    | AK223318.1  | Hypothetisches Protein        |
| 1          | CUG2        | AY902475.1  | Hypothetisches Protein        |
| 1          | IGLC1       | NG_000002.1 | Immunoglobulin                |
| 1          | COX7B       | BC018386.1  | Mitochondrium/Enzym           |
| 1          | RANBP5      | BC001497.2  | Nucleärer Proteinimport       |
| 1          | FKBP3       | BC020809.1  | Proteinfaltung                |
| 1          | RAN         | BC016654.1  | Proteintransport              |
| 1          | MRPL47      | AF285120.1  | Ribosomales Protein           |
| 4          | RPL37       | AJ293391.1  | Ribosomales Protein           |
| 4          | RPL37       | AJ293407.1  | Ribosomales Protein           |
| 1          | RPL18       | BC009708.2  | Ribosomales Protein           |
| 1          | RPL26       | CR625206.1  | Ribosomales Protein           |
| 1          | RPL26       | NM_000987.2 | Ribosomales Protein           |
| 3          | KIAA0084    | AY239295.1  | Signaltransduktion            |
| 1          | STAT2       | NM_003877.1 | Signaltransduktion            |
| 2          | ARHH        | Z35227.1    | Signaltransduktion            |
| 1          | SPF31       | AF083190.1  | Splicing                      |
| 1          | HNRPC       | BC003394.1  | Splicing                      |
| 2          | HNRPDL      | BC007392.2  | Splicing                      |
| 1          | HRMT1L2     | BC019268.1  | Splicing                      |
| 2          | HNRPA1      | BC052296.1  | Splicing                      |
| 1          | HOXD13      | AF005219.1  | Tanskriptionsfaktor           |
| 1          | HSF4B       | AB029348.1  | Tanskriptionsfaktor/Aktivator |
| 1          | TAF7        | BC032737.1  | Transkription                 |
| 1          | THOC3       | BC068499.1  | Transkription                 |
| 2          | CREB3       | U59629.1    | Transkriptionsfaktor          |
| 1          | NHP2L1      | BC095439.1  | Translation                   |
| 1          | <b>CD3D</b> | BC039035.1  | Transmembranprotein/Rezeptor  |
| 2          | UCP2        | AK222557.1  | Transporter/Mitochondrion     |
| 1          | ATP5E       | BC001690.1  | Transporter/Mitochondrion     |
| 1          | HSPC150     | AF160215.1  | Ubiquitinkonjugation          |

|   |               |            |                 |
|---|---------------|------------|-----------------|
| 8 | MLV-HeLa-1003 | AY516857.1 | Virale Sequenz  |
| 1 | GRN           | BC000324.2 | Wachstumsfaktor |
| 1 | ADD3          | AB209810.1 | Zytoskelett     |
| 1 | STOML2        | BC014990.1 | Zytoskelett     |
| 1 | K-ALPHA-1     | BC021564.1 | Zytoskelett     |

In Tabelle 4.1.1 und 4.1.2 sind die Ergebnisse der Sequenzierung für NK3.3- und Jurkat-Zellen aufgelistet. Die Sequenzen wurden nach der jeweiligen Funktion des Genproduktes, soweit bekannt, klassifiziert. Für NK3.3 sind Gene vertreten, deren Vorhandensein in einer NK-Zelllinien zu erwarten sind (fettgedruckt); für den Rezeptor KIR2DL3, für KIR-103AST (Vorläufer für den 2DL4-Rezeptor) und für den Lektin-artigen Rezeptor KLRB1, sowie IL2RG, CD2, CD74 und CD96. In Jurkat-Zellen wurde dagegen als T-Zelltypisches Gen CD3D (fettgedruckt) gefunden, ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes.

In Abbildung 4.1.4 und 4.1.5 ist die prozentuale Verteilung der Sequenzen auf die verschiedenen Klassen von Genen dargestellt. Hierbei fällt auf, dass für einige Genklassen keine Sequenzen in Jurkat-Zellen gefunden wurden; für Antigenpräsentation, Apoptose, Membranproteine, MHC, Replikation, Zellzyklus und Zytotoxizität. Ebenfalls finden sich keine unklassifizierten Sequenzen. Der Hauptgrund für die geringere Anzahl an Genklassen für Jurkat-Zellen liegt vor allem in der deutlich kleineren Anzahl sequenzierter Klone, die nur 69 auswertbare Sequenzen ergaben im Gegensatz zu 235 bei NK3.3-Zellen. Da das Hauptinteresse den in NK-Zellen und NK-Zellähnlichen Zellen differentiell exprimierten Gene galt, wurden in den subtraktiven cDNA-Banken aus diesen Zellpopulationen jeweils mehr Klone sequenziert.

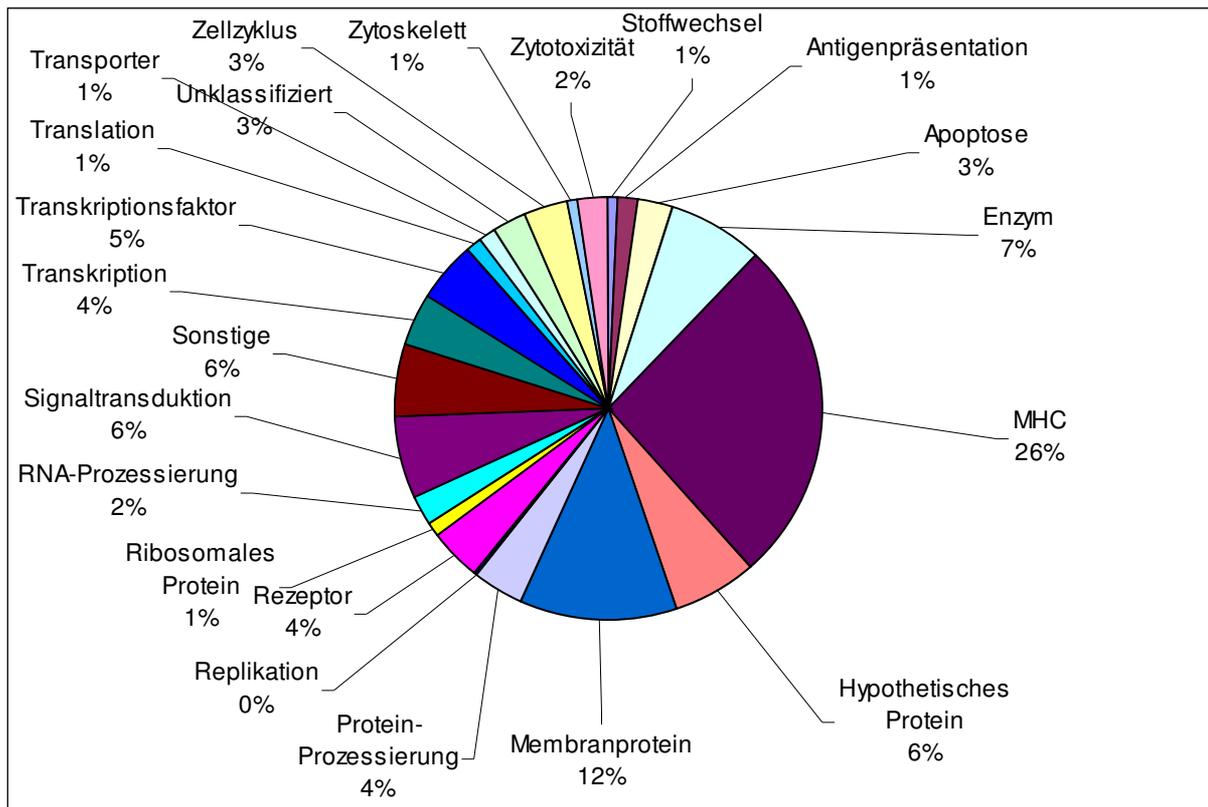


Abb. 4.1.4: NK3.3-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone auf verschiedene Genklassen.

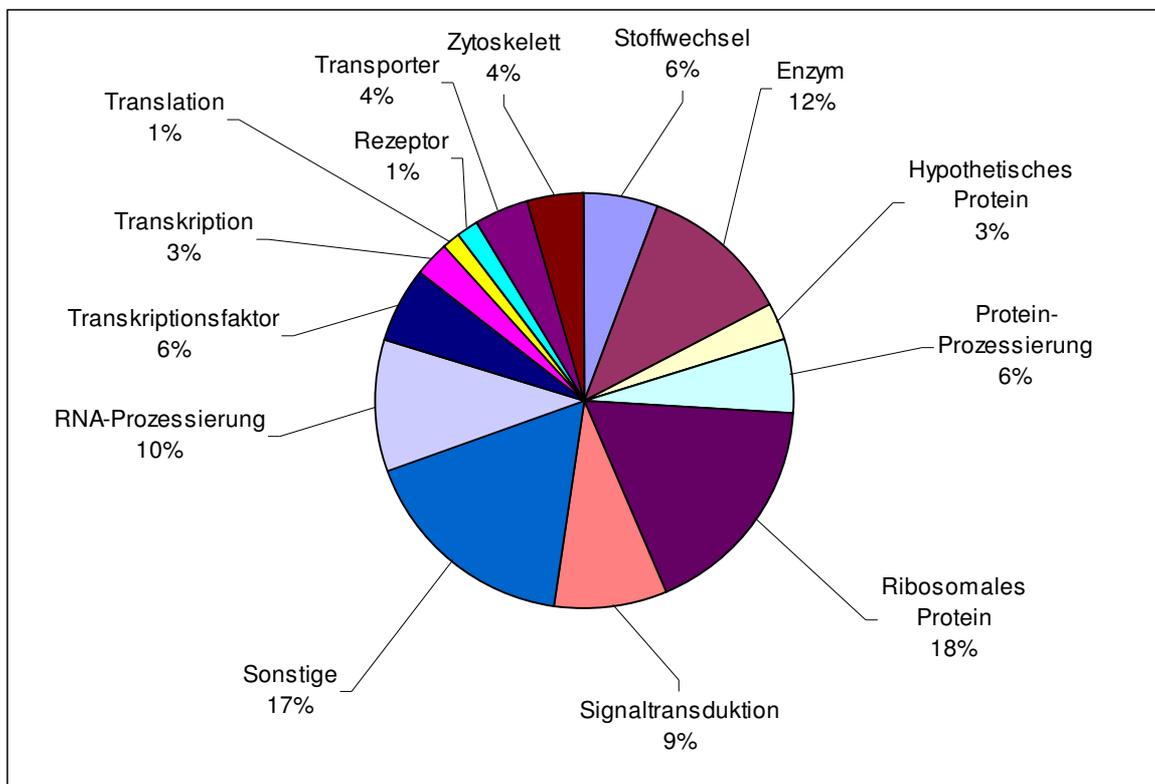
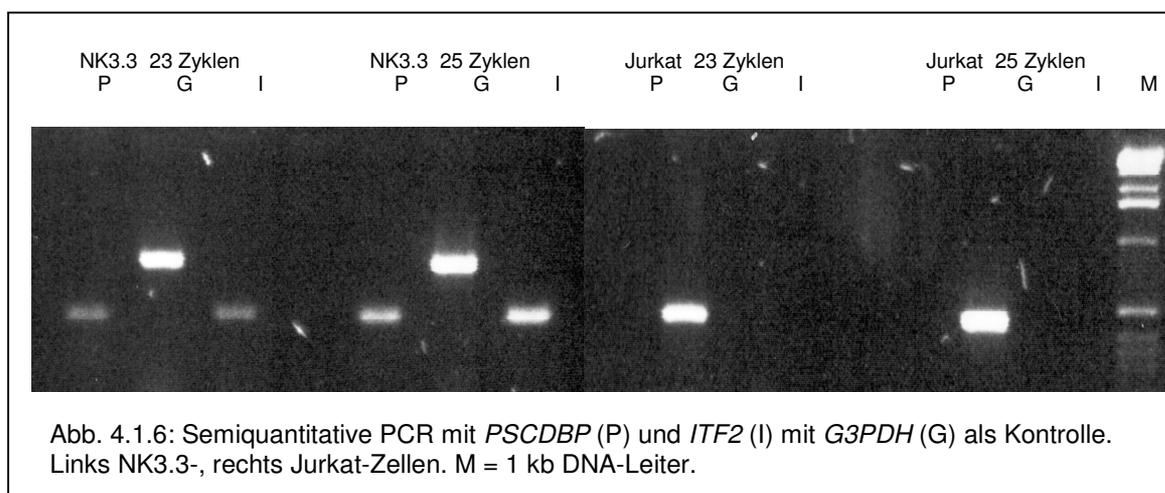


Abb. 4.1.5: Jurkat-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone auf verschiedene Genklassen.

#### 4.1.9 Expressionsanalyse mit PCR und Real-time PCR

Aus den subtraktiven cDNA-Banken für NK3.3- und Jurkat-Zellen wurden einige Gene ausgewählt, die in nur einer der beiden Zellpopulationen gefunden wurden, um deren Expression mittels PCR zu untersuchen. Für NK3.3-Zellen wurde auf diese Weise für *ZNF216*, *EEF1A1*, *CDKN1A*, *ITF2*, *PSCDBP* und *BHLHB2* eine differentielle Expression gegenüber Jurkat-Zellen bestätigt. Für drei dieser Gene (für das Pleckstrin homology Sec7 and coiled-coil domains-binding protein (*PSCDBP*) und den Immunoglobulin transcription factor 2 (*ITF2*), sowie das Class B basic helix-loop-helix protein 2 (*BHLHB2*)) zeigt die Abbildung 4.1.7 die Expression in NK3.3- und Jurkat-Zellen. Zunächst wurde die Expression in NK3.3- und Jurkat-Zellen mit einer semiquantitativen PCR untersucht. Hierzu wurde nach 15, 17, 19, 21, 23 und 28 Zyklen PCR-Produkt entnommen und nach Ende der PCR auf einem Agarosegel analysiert. Abbildung 4.1.6 zeigt als Beispiel die Ergebnisse für *PSCDBP* und *ITF2*. Für diese beiden Gene konnte die differentielle Expression schon auf diese Weise bestätigt werden; während bei NK3.3-Zellen bereits nach 23 Zyklen deutliche Banden für *PSCDBP* und *ITF2* zu sehen sind, ist bei Jurkat-Zellen auch nach 28 Zyklen für beide kein Produkt vorhanden, d.h. diese Gene werden in Jurkat-Zellen nur sehr schwach und kaum darstellbar exprimiert. Für die übrigen Gene konnte in Jurkat- gegenüber NK3.3-Zellen zwar ein Transkript detektiert werden, allerdings in deutlich geringern Mengen.



Anschließend wurden Real-time PCR-Experimente mit denselben Primern unter Verwendung von SYBR<sup>®</sup> Green durchgeführt. Die Ergebnisse, die differentielle Expression aller drei Gene in NK3.3- gegenüber Jurkat-Zellen, zeigt die Abbildung 4.1.7. Die Expression ist relativ zur Expression von *G3PDH* dargestellt und wurde auf die Expression in Jurkat-Zellen normiert (Wert für Jurkat ist jeweils = 1). Wie die Ergebnisse der semiquantitativen PCR erwarten lassen, zeigt sich der größte Unterschied bei *PSCDBP*, das in NK3.3-Zellen über 60 mal stärker exprimiert ist als in Jurkat-Zellen und bei *ITF2*, das 40 mal stärker in NK3.3-Zellen exprimiert ist. Die Expression von *BHLHB2* ist in NK3.3-Zellen um das 20-fache stärker als in Jurkat-Zellen.

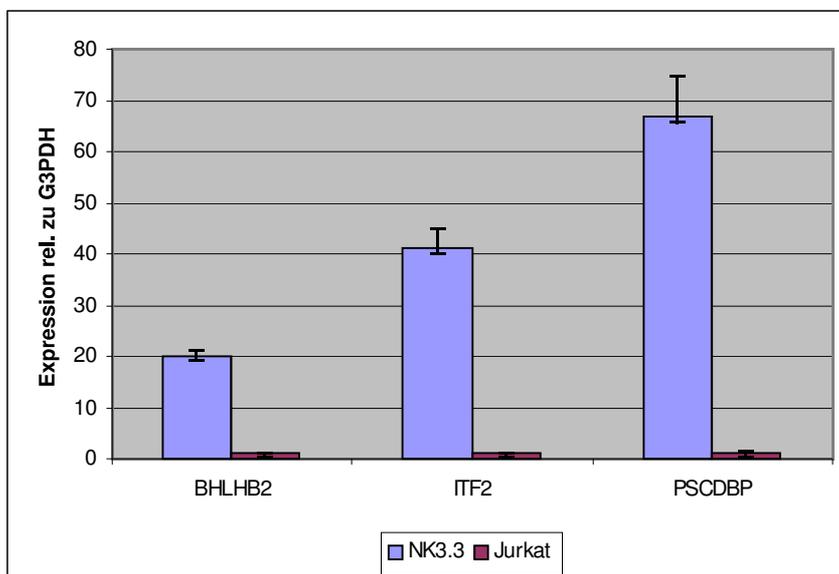


Abb. 4.1.7: Real-time PCR für in NK3.3-Zellen differentiel exprimerte Gene, normiert auf die Expression in Jurkat-Zellen.

## 4.2 NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut

Für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank wurden NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem humanem Blut von jeweils zwei gesunden Spendern isoliert (NK 1 und 2, CD8<sup>+</sup> 1 und 2). Zunächst wurden PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) isoliert, aus denen anschließend mithilfe von magnetgekoppelten Antikörpern CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen (NK-Zellen) und CD56<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) isoliert wurden. Zur Überprüfung der Reinheit der Zellpopulationen wurden die einzelnen Fraktionen mit Anti-CD56-, Anti-CD8- und Anti-CD3-Antikörpern markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (Abb.4.2.1).

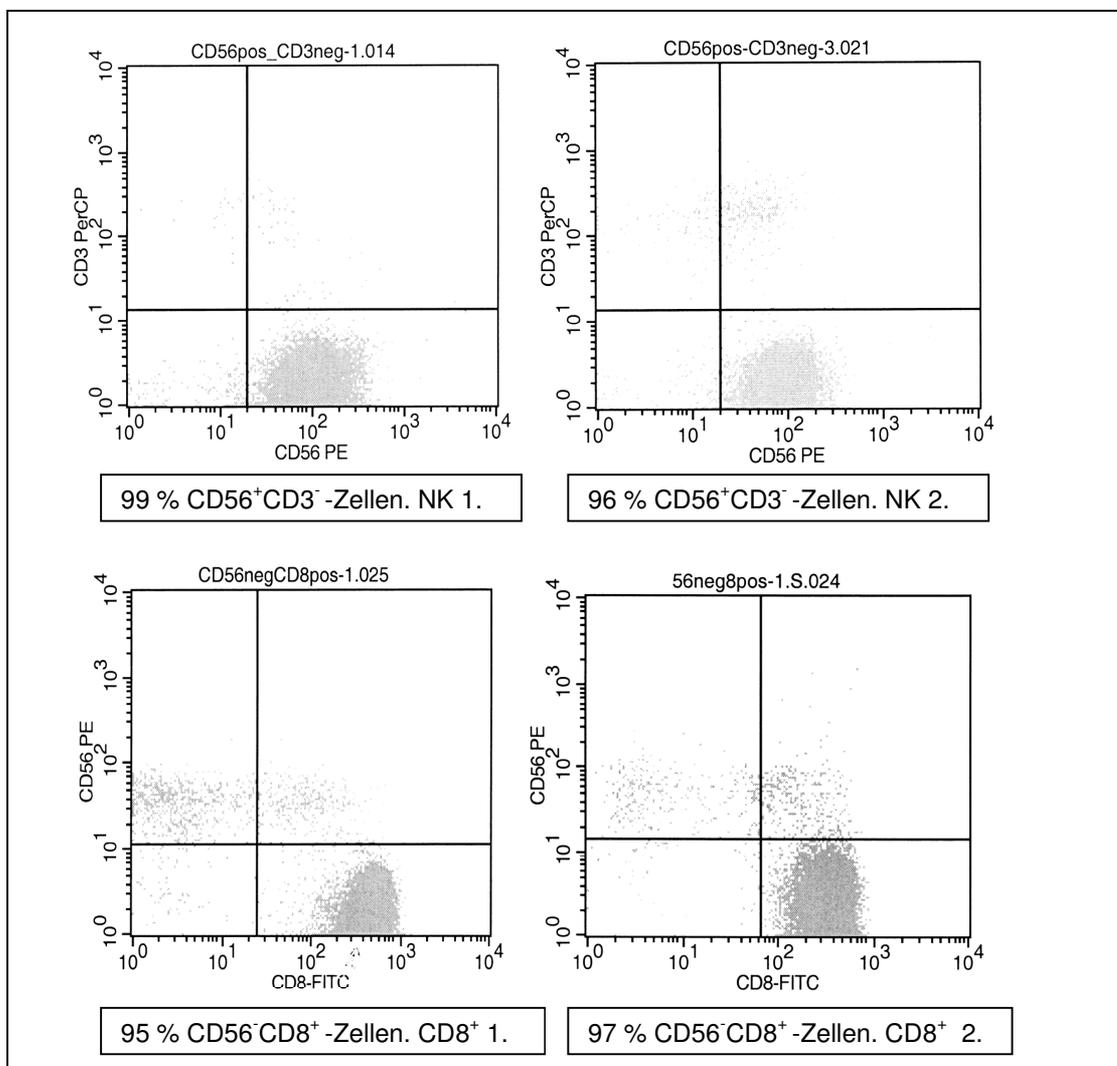


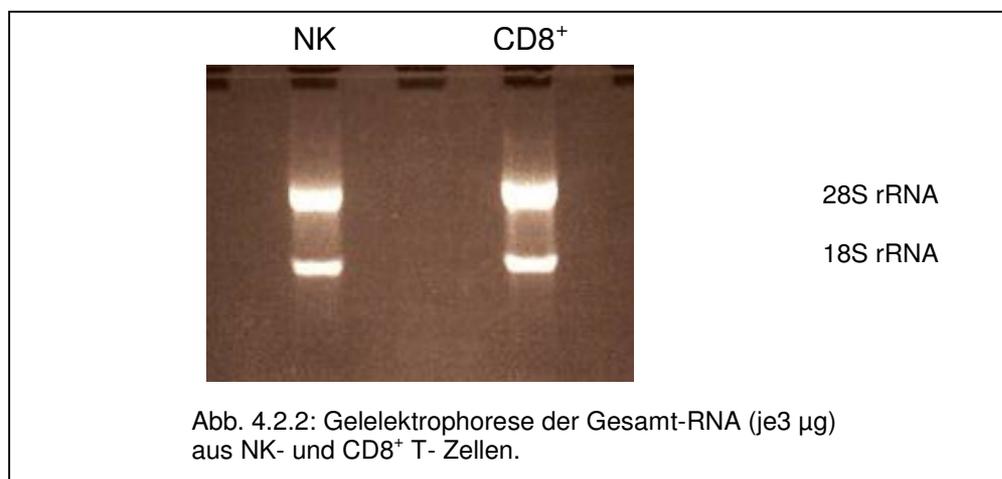
Abb. 4.2.1: Dotplot-Darstellung von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (von je zwei Spendern), markiert mit Anti-CD3-, Anti-CD8- und Anti-CD56-Antikörpern.

Durch die FACS-Analysen konnte für die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> -Zellen (NK-Zellen) eine Reinheit von 99 bzw. 96 % und für die CD56<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> -Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) von 95 bzw. 97 % ermittelt werden. Aus allen vier Proben wurde Gesamt-RNA isoliert.

#### 4.2.1 Denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Kontrolle der Integrität der Gesamt-RNA und zur Kontrolle des DNase-Verdau wurde die Gesamt-RNA auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung sollten sich zwei deutliche Banden bei 1,9 und bei 4,5 kb zeigen, die die eukaryotische ribosomale 18S und 28S RNA repräsentieren. Dazwischen sollten keine kleineren, als „Schmier“ sichtbaren Fragmente zu sehen sein, da dies auf einen Abbau der RNA durch RNasen hindeutet. Über der 28S-Bande sollte keine weitere Bande vorhanden sein, da dies ein Hinweis auf genomische DNA ist.

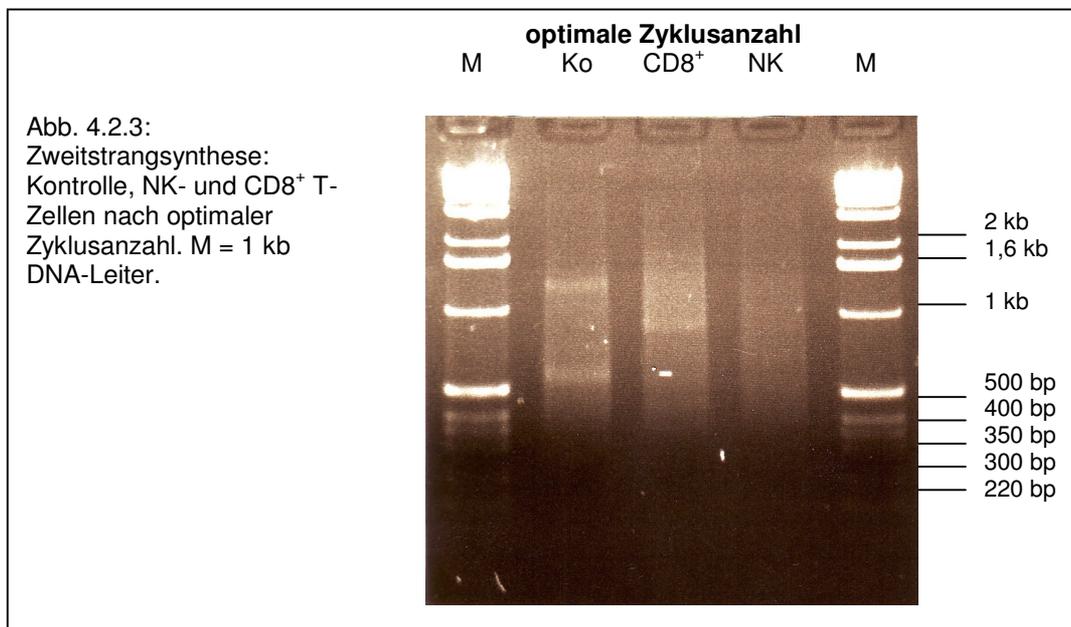
Die untersuchten RNA-Proben (Abbildung 4.2.2) zeigen distinkte Banden für die 18S und 28S rRNA, was die Integrität der RNA bestätigt. Es sind keine Banden für genomische DNA vorhanden, was die Effektivität des DNase-Verdau zeigt.



#### 4.2.2 cDNA-Synthese für NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für die subtraktiven cDNA-Banken konnte sowohl Gesamt-RNA als auch mRNA als Ausgangsmaterial verwendet werden. Bei Präparationen, die zu wenig Gesamt-RNA lieferten, sodass keine anschließende mRNA-Isolierung durchgeführt werden konnte,

wurde die SMART™ Technologie angewendet. Hierbei wurde für die Erststrangsynthese der CDS-Primer und das SMART II Oligonucleotid verwendet, die beide die Bindungsstelle für den in der anschließenden Zweitstrangsynthese eingesetzten PCR-Primer schaffen. Als Kontrolle wurde eine humane Skelettmuskel-RNA (Clontech) parallel zu den Proben verarbeitet. Die PCR der Zweitstrangsynthese wurde mit der optimalen Zyklusanzahl durchgeführt, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen bei gleichzeitig möglichst geringem Anteil an unerwünschten häufig vorhandenen Transkripten. Die optimale Zyklusanzahl wurde durch eine semiquantitative PCR ermittelt, bei der nach 15, 17, 19, 21, 23 und 24 Zyklen PCR-Produkt entnommen und auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde. Als optimale Zyklusanzahl wurde ein Zyklus weniger gewählt, als der, bei dem keine weitere Zunahme an PCR-Produkt beobachtet werden konnte. Für die Kontrolle (humaner Skelettmuskel) wurden so 16 Zyklen ermittelt, für NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen jeweils 22 Zyklen. Abbildung 4.2.3 zeigt die Kontrolle, NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen nach der optimierten Zyklusanzahl.



### 4.2.3 Subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

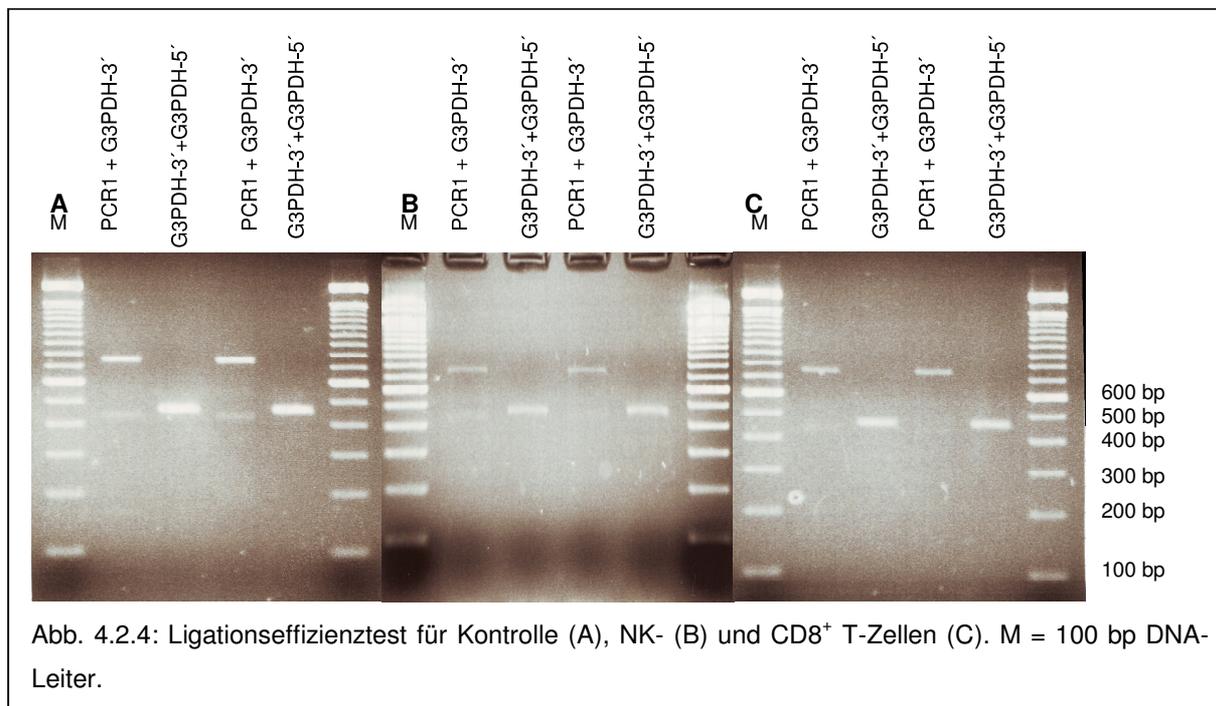
Zur Identifizierung von in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen differentiell exprimierten Genen wurde mithilfe der PCR-Select<sup>TM</sup> Methode (Clontech) eine subtraktive cDNA-Bank hergestellt. Zur Kontrolle der Effizienz der einzelnen Schritte der Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank wurden verschiedene Tests durchgeführt. Hierfür wurde während der gesamten Prozedur eine Kontrolle aus getesteter RNA mitgeführt, der nach der cDNA-Synthese zur Hälfte Fragmente aus *Hae*III-verdauter  $\phi$ X174-DNA beigemischt wurden, die differentiell exprimierte Gene repräsentieren sollten. Für eine Überprüfung des letzten Schrittes der Subtraktion wurde eine vorgefertigte „kontrollsubtrahierte“ Probe (Clontech) verwendet, die die gleichen Fragmente wie die selbsterstellte Kontrolle enthielt.

### 4.2.4 Kontrolle des *Rsa*I-Verdau der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Effizienz des Restriktionsverdau mit *Rsa*I wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Es wurde die verwendete cDNA zusammen mit der unverdauten cDNA auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert. Die unbehandelte cDNA sollte als Schmier von 0,5 – 10 kb zu sehen sein, die verdaute cDNA hingegen als Schmier von 0,1 – 2 kb. Der Verdau der cDNA verlief vollständig; die mit *Rsa*I verdauten cDNAs zeigten sich als Schmier von 0,1 – 2 kb, während die unbehandelte cDNA als Schmier von 0,5 – 10 kb zu sehen war.

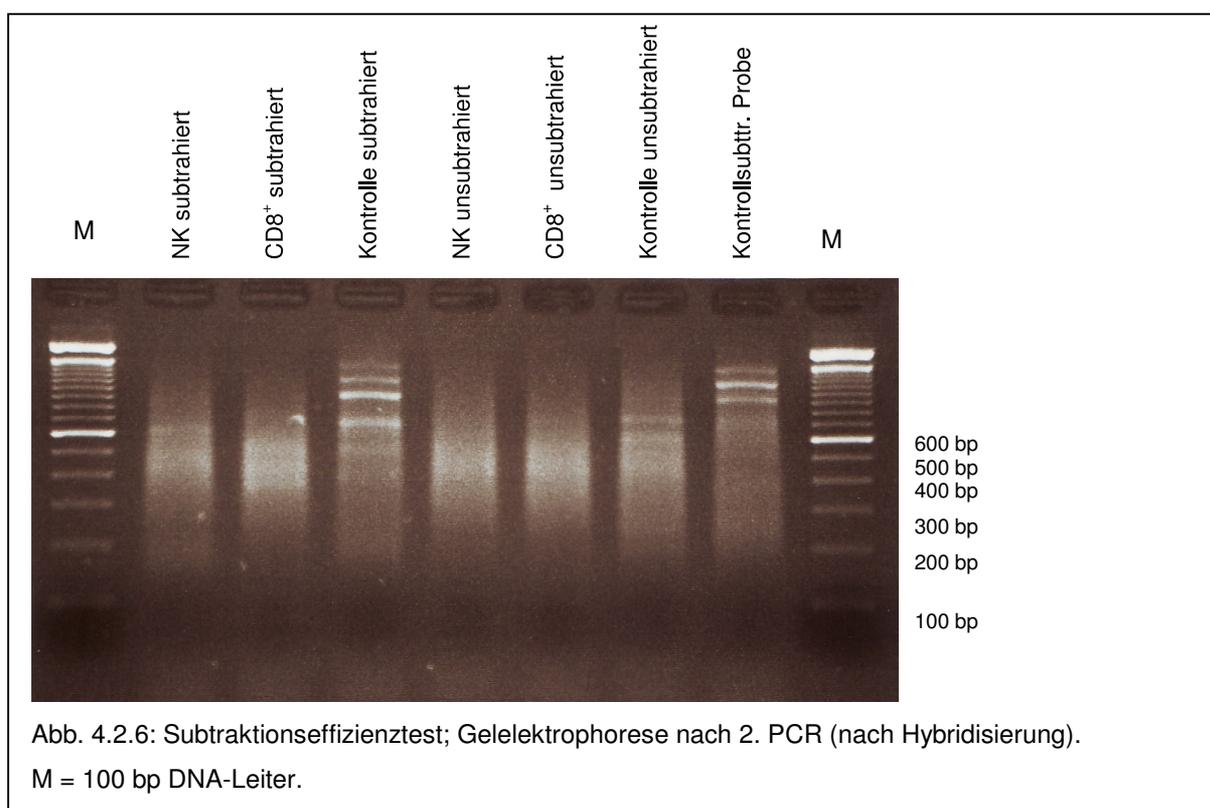
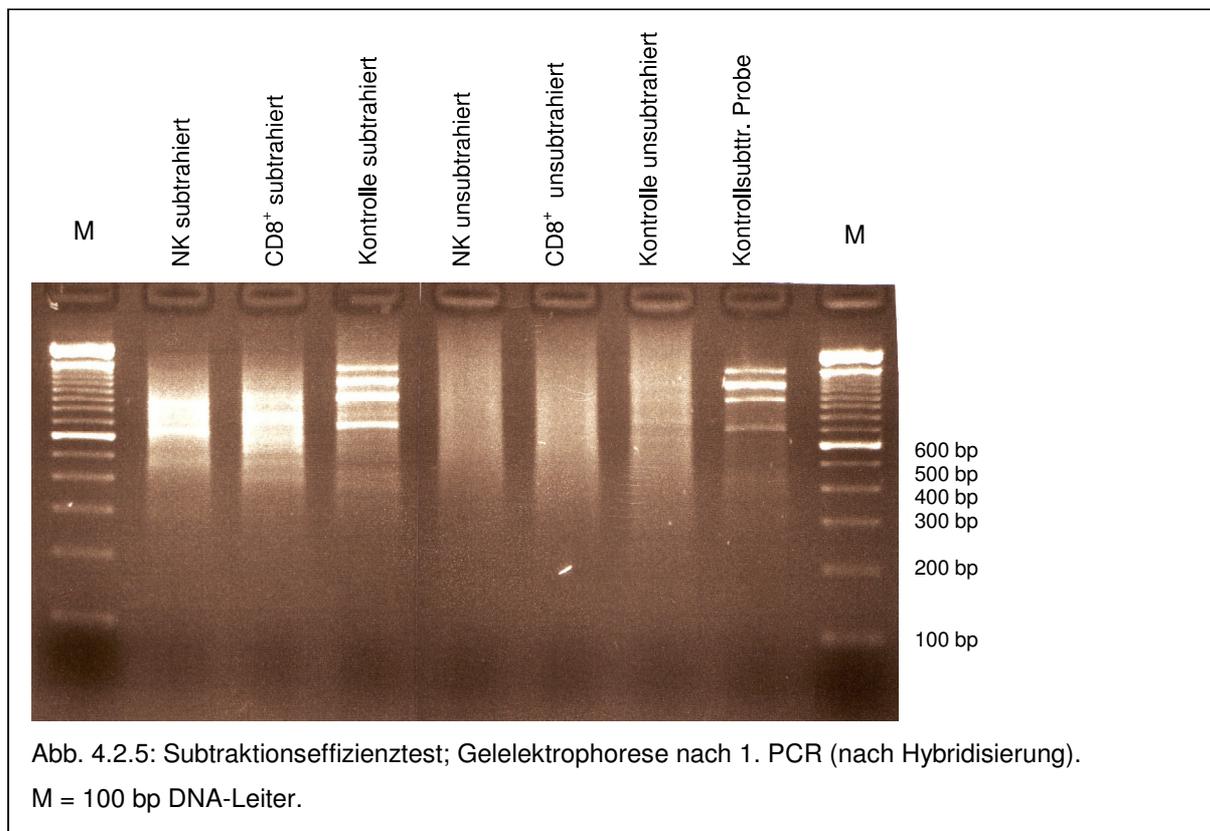
### 4.2.5 Ligationseffizienztest der Subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für eine Weiterverarbeitung der Ligationsprodukte musste kontrolliert werden, ob jeweils wenigstens 25% der cDNA mit Adaptoren ligiert worden waren. Hierzu wurde eine PCR mit G3PDH-3' und Primer 1 durchgeführt, die bereits genauer für NK3.3 und Jurkat beschrieben wurde. Abbildung 4.2.4 zeigt die Agarosegelelektrophorese von Kontrolle, NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und bestätigt eine ausreichende Effizienz der Adaptorligation für alle Proben.



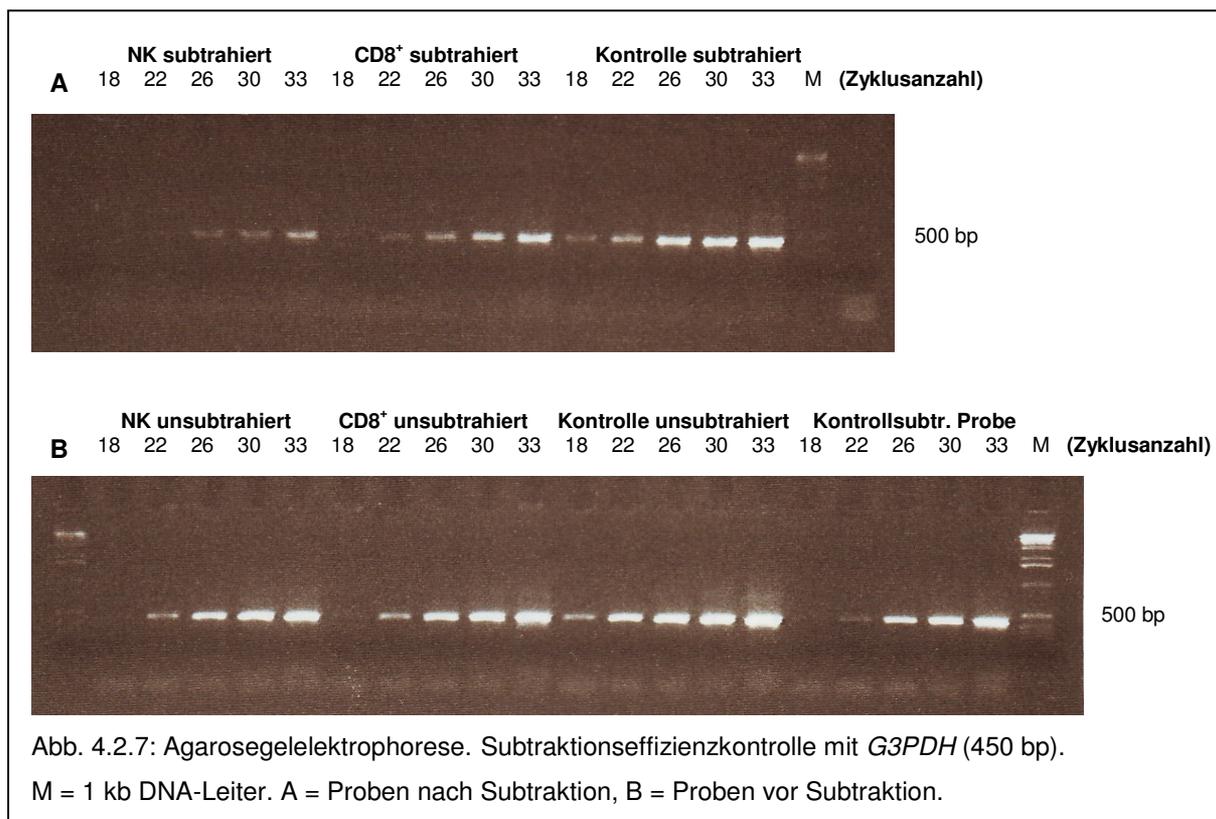
#### 4.2.6 Subtraktionseffizienztest der Subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Nach dem ersten Hybridisierungsschritt wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert. Bei erfolgreicher Subtraktion sollten in der Kontroll-DNA die  $\phi$ X174/*Hae*III-Banden zu sehen sein. Die Abbildung 4.2.5 zeigt, dass die Hybridisierung erfolgreich war; in der kontrollsubtrahierten Probe sind die entsprechenden Banden vorhanden. Bei den übrigen Proben ist der zu erwartende Schmier zwischen 0,2 und 2 kb mit einigen deutlicheren Banden zu sehen. Nach dem zweiten Hybridisierungsschritt wurde erneut eine Kontrolle der PCR-Produkte auf einem Agarosegel durchgeführt (Abbildung 4.2.6). Hierbei zeigte sich wie erwartet dasselbe Bandenmuster bei der kontrollsubtrahierten Probe und der Kontroll-DNA mit  $\phi$ X174/*Hae*III-Fragmenten.



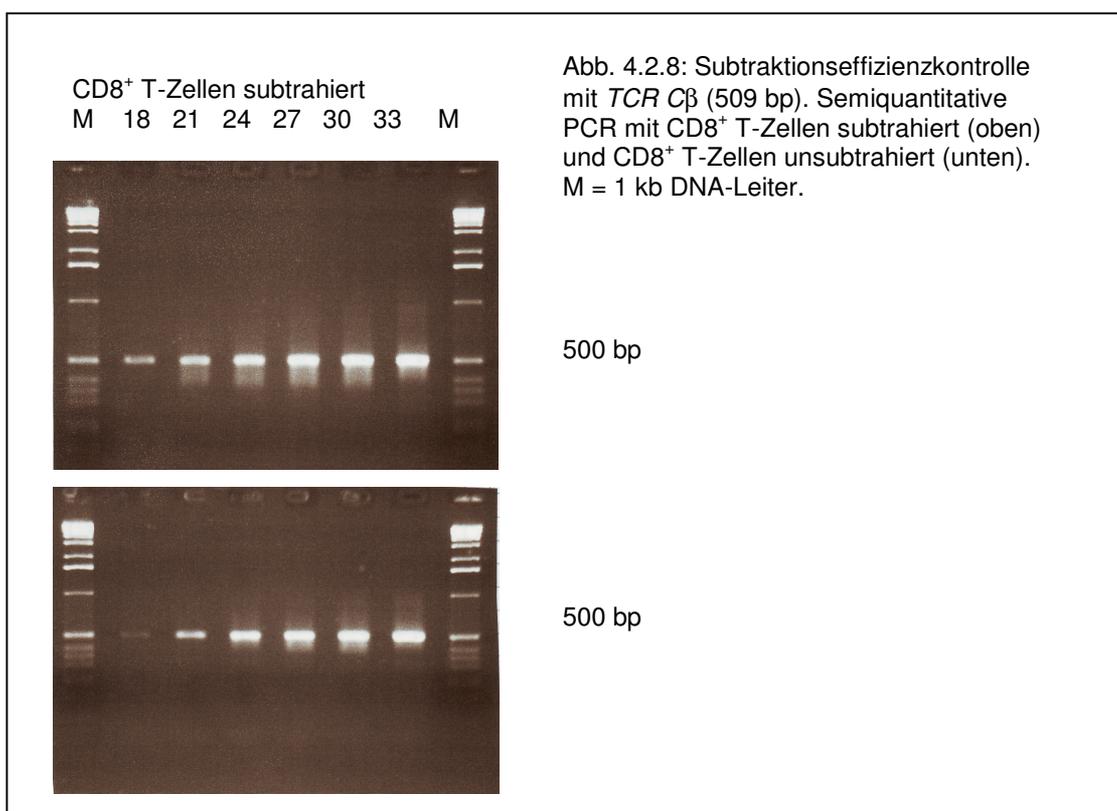
#### 4.2.7 Subtraktionseffizienzkontrolle mit *G3PDH* für die subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Als letzte Kontrolle der gesamten Subtraktion wurde eine PCR der subtrahierten und der unsubtrahierten cDNA mit *G3PDH*-Primern durchgeführt. Mit *G3PDH* wurde ein Gen ausgewählt, das als sogenanntes „housekeeping gene“ häufig exprimiert wird und somit durch die PCR-Select<sup>TM</sup> Methode, die auf seltene Transkripte selektieren soll, im Verlauf der Subtraktion zurückgehen sollte. Die PCR-Produkte wurden zur Verdeutlichung geringer Unterschiede in der Amplifikation nach 18, 22, 26, 30 und 33 Zyklen entnommen und analysiert. Die Abbildung 4.2.7 zeigt, dass das *G3PDH*-Transkript in den subtrahierten Proben zurückgegangen ist und eine deutliche Bande erst nach mindestens 26 Zyklen zu sehen ist, während es in den unsubtrahierten Proben sehr häufig vorkommt und eine deutliche Bande schon nach 22 Zyklen erscheint.



#### 4.2.8 Subtraktionseffizienzkontrolle mit TCR C $\beta$ für die subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Als weitere Kontrolle für die Effizienz der Subtraktion wurde das Vorhandensein eines Transkriptes untersucht, das nur in T-Zellen, nicht aber in NK-Zellen oder in der Kontrolle vorhanden sein sollte. Hierzu wurden Primer für den T-Zell-Rezeptor (TCR) verwendet, mit denen wie zuvor für *G3PDH* eine semiquantitative PCR durchgeführt wurde. Für die subtrahierten und unsubtrahierten Proben aus NK-Zellen und Kontrolle wurde diese PCR ebenfalls durchgeführt, wie zu erwarten zeigte sich hier kein Produkt, da *TCR C $\beta$*  hier nicht exprimiert wird. In der Abbildung 4.2.8 ist für CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist zu sehen, dass durch die Subtraktion eine Anreicherung an *TCR C $\beta$*  erzielt wurde. Vor der Subtraktion ist eine starke Bande für das *TCR C $\beta$* -Transkript erst nach 24 Zyklen vorhanden, während nach der Subtraktion schon nach 21 Zyklen eine ähnlich starke Bande zu sehen ist.



#### 4.2.9 Differential screening der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Nach der Subtraktionseffizienzkontrolle wurden die PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 kloniert und in *E.coli* TOP10F<sup>'</sup> transformiert. Mittels blau-weiß-Selektion wurden positive Klone ausgewählt und für Plasmidpräparationen oder Kolonie-PCR verwendet. In der Kolonie-PCR wurden die Inserts mit Nested-Primern amplifiziert (Abb. 4.2.9), bei den Plasmidpräparationen wurden die Inserts mit *EcoRI* herausgeschnitten (Abb. 4.2.10). Somit konnten mittels Agarosegelelektrophorese die Klone bestimmt werden, die ein Insert trugen.

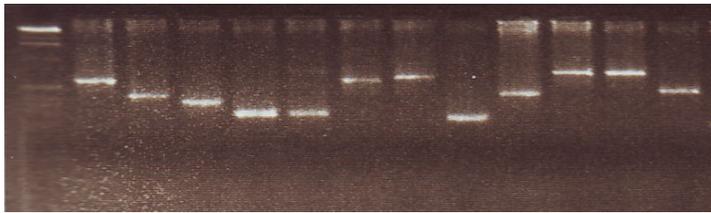


Abb. 4.2.9: Mittels Kolonie-PCR und Nested-Primern amplifizierte Inserts.

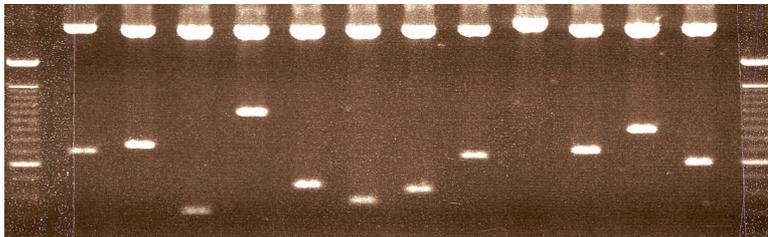
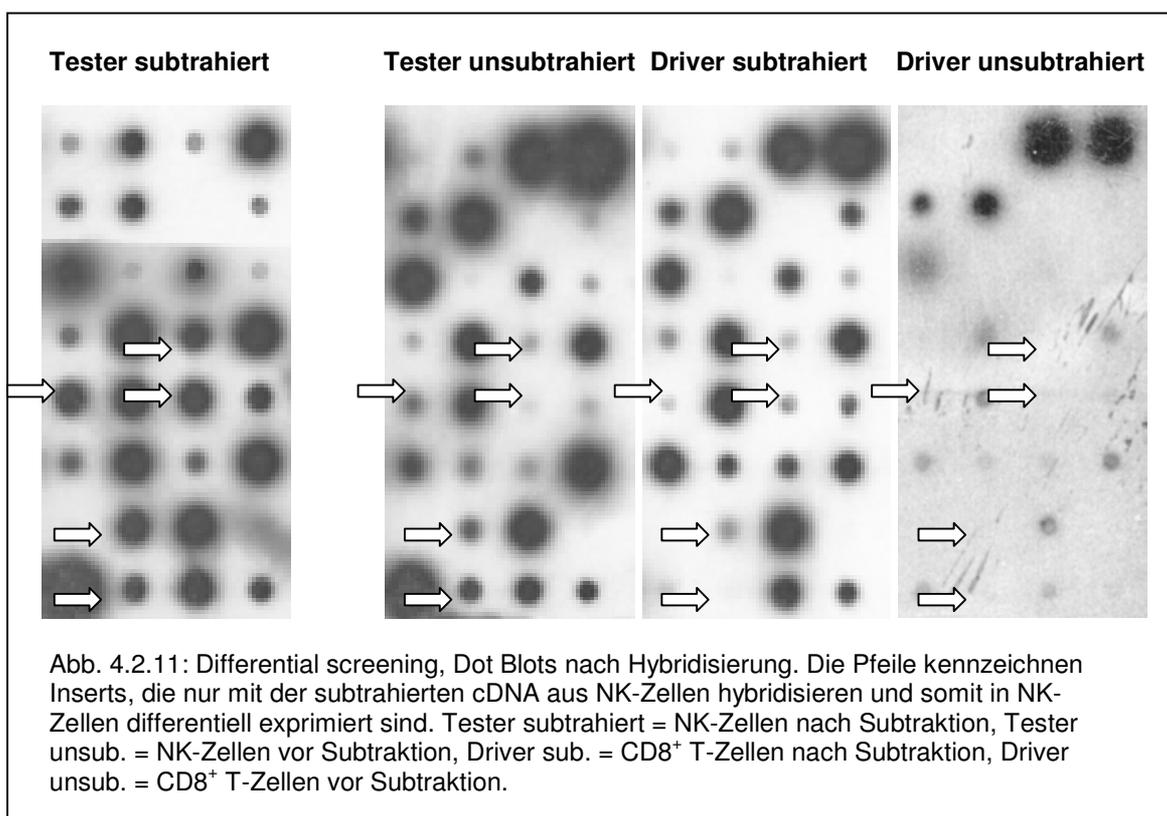


Abb. 4.2.10: Inserts nach *EcoRI*-Verdau der Plasmidpräparationen.

Für das differential screening wurden die mit den Nested-Primern amplifizierten Inserts auf Nylonmembranen aufgetragen (Dot Blot) und mit verschiedenen cDNA's hybridisiert. Hierbei wurde markierte cDNA desselben Ausgangsmaterials „Tester“ (unsubtrahierte Probe), sowie cDNA der anderen Zellpopulation, des „Drivers“ (unsubtrahierte Probe) verwendet und cDNA von „Tester“ und „Driver“ nach der Subtraktion (subtrahierte Proben). Inserts aus eindeutig differentiell exprimierten Genen sollten nur mit der cDNA desselben Ausgangsmaterials und mit dessen subtrahierter Probe hybridisieren, wobei letzteres ein besonders starkes Signal geben sollte, da bevorzugt seltene Transkripte im Verlauf der Subtraktion angereichert werden sollen.

Die Abbildung 4.2.11 zeigt Dot Blots von NK-Zell-Inserts, die mit radioaktiv markierter cDNA von NK-Zellen subtrahiert („Tester subtrahiert“), von NK-Zellen unsubtrahiert („Tester unsubtrahiert“) und von CD8<sup>+</sup> T-Zellen subtrahiert („Driver subtrahiert“) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unsubtrahiert („Driver unsubtrahiert“) hybridisiert wurden. Die Pfeile kennzeichnen hierbei Inserts, die in NK-Zellen differentiell exprimiert sind, da sie bei der Hybridisierung mit der subtrahierten NK-Zell-Probe ein besonders deutliches Signal, in der unsubtrahierten NK-Zell-Probe ein schwächeres Signal und bei den Dot Blots aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur ein sehr schwaches oder gar kein Signal liefern. Es wurden nur Inserts als differentiell exprimiert angesehen, die entweder ein deutliches Hybridisierungssignal mit dem subtrahierten Tester oder sowohl mit dem subtrahierten als auch mit dem unsubtrahierten Tester lieferten.



#### 4.2.10 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene aus der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Inserts der positiven Klone wurden über Plasmidpräparationen isoliert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen wurden mithilfe des BLAST-Programms analysiert und die Ergebnisse in Tabellen zusammengefasst.

Für NK-Zellen wurden 946 Inserts sequenziert, von denen 775 ausgewertet werden konnten. Von diesen sind 558 Sequenzen insgesamt 129 bekannten Genen zuzuordnen (Tabelle 4.2.1), während 217 Sequenzen 121 verschiedene DNA-Klone repräsentieren.

Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden 436 Inserts sequenziert, von denen 322 ausgewertet werden konnten (Tabelle 4.2.2). Diese 322 Sequenzen verteilen sich auf 104 verschiedene Gene.

Die Aufteilung der Tabellen erfolgte wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben in Häufigkeit, Gensymbol, Accession-Number und Klassifizierung.

Tab 4.2.1: Differentiell exprimierte Gene in NK-Zellen.

| Häufigkeit | Gensymbol    | Acc.-Nr.    | Klassifizierung       |
|------------|--------------|-------------|-----------------------|
| 1          | ACINUS       | NM_014977.1 | Apoptose              |
| 1          | CUGBP2       | AF295066.1  | Apoptose              |
| 3          | KIFAP3       | NM_014970.2 | Chromosomenbewegung   |
| 3          | KIAA0138     | BC025279.1  | DNA-bindendes Protein |
| 1          | ZNF403       | NM_024835.1 | DNA-bindendes Protein |
| 2          | BLVRA        | XM_041033.3 | Enzym                 |
| 2          | HECTD1       | XM_030175.3 | Enzym                 |
| 2          | KIAA0853     | NM_015070.2 | Enzym                 |
| 2          | KIAA1851     | AB058754.1  | Enzym                 |
| 2          | PLACE1000547 | AK024319.1  | Enzym                 |
| 2          | PPP1CB       | AC097724.6  | Enzym                 |
| 2          | PTP4A2       | NM_003479.2 | Enzym                 |
| 1          | HEP14459     | AK025736.1  | Enzym                 |
| 1          | JIK          | BC002756.1  | Enzym                 |
| 1          | LOC123803    | NM_173474.1 | Enzym                 |
| 1          | NPEPL1       | XM_015726.3 | Enzym                 |
| 1          | SDR1         | BC002730.1  | Enzym                 |
| 3          | 267D11       | AC004812.1  | GTPase Aktivität      |

|    |                |             |   |
|----|----------------|-------------|---|
| 2  | DKFZp762H185   | BC044645.1  | Hypothetisches Protein                  |
| 2  | FLJ20281       | NM_017742.1 | Hypothetisches Protein                  |
| 2  | KIAA1235       | AB033061.1  | Hypothetisches Protein                  |
| 2  | MGC14595       | BC022441.1  | Hypothetisches Protein                  |
| 2  | MGC3200        | NM_032305.1 | Hypothetisches Protein                  |
| 1  | KIAA1376       | XM_033042.3 | Hypothetisches Protein                  |
| 1  | KIAA1557       | XM_028289.2 | Hypothetisches Protein                  |
| 1  | KIAA1673       | XM_047672.6 | Hypothetisches Protein                  |
| 2  | FCN1           | NM_002003.2 | Lektin                                  |
| 2  | SERP1          | NM_014445.2 | Membranprotein/ER, Ribosomen            |
| 3  | FUR            | NM_002569.2 | Membranprotein/Marker                   |
| 1  | SLC2A3         | XM_049663.1 | Membranprotein/Transporter              |
| 2  | VAPA           | BC002992.1  | Membranprotein/Vesikeltransport         |
| 2  | MMP23B         | AL031282.1  | Metalloproteinase                       |
| 35 | HLA-DRA        | NM_019111.2 | MHC                                     |
| 10 | HLA-DRB1       | X00700.1    | MHC                                     |
| 2  | TAPBP          | NM_003190.3 | MHC                                     |
| 1  | HLA-E          | XM_165764.1 | MHC                                     |
| 1  | PAI-RBP1       | NM_015640.1 | mRNA Stabilisierung                     |
| 1  | RAE1           | U85943.1    | mRNA Transport                          |
| 1  | ITGB2          | AK097216.1  | Oberflächenmolekül/Adhäsionsmolekül     |
| 2  | ECGF1          | M58602.1    | Phosphorylase                           |
| 2  | MBTPS2         | U73479.1    | Protease/membranständig                 |
| 2  | PSMB1          | NM_002793.2 | Proteasom                               |
| 2  | PSMD9          | NM_002813.3 | Proteasom                               |
| 1  | UBE2G2         | BC001738.1  | Proteasom                               |
| 1  | NCE2           | NM_080678.1 | Proteinexport/integrales Membranprotein |
| 3  | KIAA0561       | XM_038150.2 | Proteinkinase                           |
| 3  | RAB8           | AK025165.1  | Proteintransport                        |
| 1  | TIMM17A        | BC015098.1  | Proteintransport                        |
| 3  | NPM1P20        | AL137779.6  | Pseudogen                               |
| 1  | TNFRSF1B       | NM_001066.2 | Rezeptor                                |
| 8  | <b>KLRB1</b>   | NM_002258.1 | Rezeptor                                |
| 1  | BY55           | BC014465.1  | Rezeptor                                |
| 1  | FCGR3A         | NM_000569.4 | Rezeptor                                |
| 1  | IL3RA          | D49410.1    | Rezeptor                                |
| 1  | <b>KIR3DL2</b> | NM_006737.1 | Rezeptor                                |
| 3  | IMPG2          | AF271371.2  | Rezeptorfunktion                        |
| 9  | RPL34          | NM_033625.1 | Ribosomales Protein                     |
| 8  | RPL11          | NM_000975.2 | Ribosomales Protein                     |
| 3  | RPL6           | HUMTR107    | Ribosomales Protein                     |
| 3  | RPS12          | NM_001016.2 | Ribosomales Protein                     |
| 2  | RPS9           | BC000802.1  | Ribosomales Protein                     |
| 1  | RPS25          | BC004986.1  | Ribosomales Protein                     |

|    |                |             |                                 |
|----|----------------|-------------|---------------------------------|
| 1  | RPS4X          | NM_001007.2 | Ribosomales Protein             |
| 2  | PS1D           | NM_016505.2 | RNA Prozessierung               |
| 1  | DDX16          | XM_165782.1 | RNA Prozessierung               |
| 1  | DDX27          | NM_017895.6 | RNA Prozessierung               |
| 1  | HNRPDL         | NM_031372.1 | RNA Prozessierung               |
| 1  | NSAP1          | BC040844.1  | RNA Prozessierung               |
| 1  | RNPC1          | BC018711.1  | RNA Splicing                    |
| 1  | SNRPA1         | NM_003090.1 | RNA Splicing                    |
| 1  | SRRM1          | NM_005839.1 | RNA Splicing                    |
| 6  | EWSR1          | X73004.1    | RNA-bindendes Protein           |
| 2  | DBY            | BC034942.1  | RNA-Helicase                    |
| 5  | PRKCH          | BC037268.1  | Signaltransduktion              |
| 5  | RAP2B          | XM_171061.1 | Signaltransduktion              |
| 4  | PPP2R5C        | AY052369.1  | Signaltransduktion              |
| 3  | PTPRC          | NM_080922.1 | Signaltransduktion              |
| 3  | RIPK2          | AC004003.1  | Signaltransduktion              |
| 1  | C17orf35       | NM_003876.1 | Signaltransduktion              |
| 1  | IRAK4          | AY186092.1  | Signaltransduktion              |
| 1  | PPP2R2A        | NM_002717.2 | Signaltransduktion              |
| 3  | SFRS3          | BC000914.1  | Splicingfaktor                  |
| 5  | MAP1LC3B       | BC045759.1  | Strukturprotein                 |
| 3  | CIAO1          | XM_051882.1 | Transkription                   |
| 3  | SOX4           | AJ420500.1  | Transkription                   |
| 3  | <b>TCEB1</b>   | AK057889.1  | Transkription                   |
| 2  | RARRES3        | BC009678.1  | Transkription                   |
| 1  | BRCA2          | U50523.1    | Transkription                   |
| 1  | CRSP3          | NM_015979.2 | Transkription                   |
| 1  | <b>NCOA6IP</b> | NM_024831.5 | Transkription                   |
| 1  | NR4A2          | BC009288.1  | Transkription                   |
| 1  | TARDBP         | NM_007375.2 | Transkription                   |
| 2  | SMARCF1        | NM_139135.1 | Transkription/Chromatinstruktur |
| 3  | HIF1A          | U85044.1    | Transkriptionsfaktor            |
| 2  | <b>BBX</b>     | XM_056383.3 | Transkriptionsfaktor            |
| 2  | CHES1          | BC007506.1  | Transkriptionsfaktor            |
| 2  | ICSBP1         | NM_002163.1 | Transkriptionsfaktor            |
| 1  | FLI1           | XM_084649.5 | Transkriptionsfaktor            |
| 1  | ING3           | BC010851.1  | Transkriptionsfaktor            |
| 1  | LITAF          | AK095955.1  | Transkriptionsfaktor            |
| 3  | <b>ZNF145</b>  | NM_006006.3 | Transkriptionsfaktor/Zinkfinger |
| 2  | <b>ZNF211</b>  | NM_006385.1 | Transkriptionsfaktor/Zinkfinger |
| 13 | <b>ZNF236</b>  | AK000847.1  | Transkriptionsfaktor/Zinkfinger |
| 1  | <b>RREB1</b>   | XM_168097.1 | Transkriptionsfaktor/Zinkfinger |
| 6  | <b>EIF2S3</b>  | BC019906.1  | Translation                     |
| 4  | <b>EIF2B5</b>  | NM_003937.2 | Translation                     |

|     |           |             |                                       |
|-----|-----------|-------------|---------------------------------------|
| 2   | IFITM2    | BC009696.1  | Transmembranprotein                   |
| 1   | DDHD1     | XM_051692.2 | Transporter                           |
| 1   | MLC1      | NM_139202.1 | Transporter/integrales Membranprotein |
| 5   | C6orf37   | AF350451.1  | Unklassifiziert                       |
| 4   | DC48      | AF271776.1  | Unklassifiziert                       |
| 4   | KIAA0701  | BC003391.1  | Unklassifiziert                       |
| 3   | GRIPE     | BC042045.1  | Unklassifiziert                       |
| 3   | MSTP041   | AF113221.1  | Unklassifiziert                       |
| 2   | C20orf77  | AL109823.23 | Unklassifiziert                       |
| 2   | OSA2      | AF521671.1  | Unklassifiziert                       |
| 1   | 247f3     | AC004777.1  | Unklassifiziert                       |
| 1   | COX7BP2   | AL078461.38 | Unklassifiziert                       |
| 1   | HSPC041   | NM_016099.1 | Unklassifiziert                       |
| 1   | M8604 Met | U07561.1    | Unklassifiziert                       |
| 1   | PRG1      | BC015516.1  | Unklassifiziert                       |
| 2   | SUGT1     | NM_006704.2 | Zellzyklus                            |
| 1   | CCNL1     | BC038394.1  | Zellzyklus                            |
| 1   | MPHOSPH1  | BC005221.1  | Zellzyklus                            |
| 1   | ACTB      | BC016045.1  | Zytoskelett                           |
| 240 | GNLY      | NM_006433.2 | Zytotoxizität                         |
| 2   | PRF1      | BC047695.1  | Zytotoxizität                         |
| 1   | CTSB      | AK097384.1  | Zytotoxizität                         |
| 1   | GZMB      | BC030195.1  | Zytotoxizität                         |

Tab. 4.2.2: Differenziell exprimierte Gene in CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

| Häufigkeit | Gensymbol | Acc.-Nr.    | Klassifizierung           |
|------------|-----------|-------------|---------------------------|
| 1          | SLC35E1   | NM_024881.2 | Carrier                   |
| 1          | DNAJB6    | NM_005494.2 | Chaperone                 |
| 1          | HSPA8     | NM_006597.3 | Chaperone                 |
| 1          | HSD11B1   | AL022398.1  | Dehydrogenase             |
| 1          | M96       | XM_002013.6 | DNA-bindendes Protein     |
| 2          | C5orf7    | AF251039.1  | DNA-bindendes Protein     |
| 3          | SAFB2     | NM_014649.1 | DNA-bindendes Protein     |
| 4          | ODC1      | BC025296.1  | Enzym                     |
| 1          | DCTD      | NM_001921.1 | Enzym                     |
| 2          | FLJ10719  | XM_031328.6 | Hypothetisches Protein    |
| 2          | MGC45400  | NM_153333.1 | Hypothetisches Protein    |
| 2          | RGM       | NM_018385.1 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | 3PAP      | NM_018187.2 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | LOC154573 | XM_098548.1 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | LOC157697 | BC016017.1  | Hypothetisches Protein    |
| 8          | XIST      | AL353804.22 | Inaktivierung X-Chromosom |
| 1          | LRIG1     | NM_015541.1 | integrales Membranprotein |

|    |              |             |                               |
|----|--------------|-------------|-------------------------------|
| 1  | ATP2A3       | AC005940.3  | Membranprotein/Transporter    |
| 1  | ATP6V0E      | NM_005765.2 | Membranprotein/Transporter    |
| 35 | HLA-B*40012  | L41628.1    | MHC                           |
| 14 | B-8 B*0801   | XM_165765.1 | MHC                           |
| 10 | HLA-B        | BC013187.1  | MHC                           |
| 8  | HLA-B*40013  | AJ309573.1  | MHC                           |
| 4  | HLA-C        | XM_084221.1 | MHC                           |
| 3  | HLA-DRB5     | M20430.1    | MHC                           |
| 2  | HLA-B*0801   | D83956.1    | MHC                           |
| 1  | B2M          | M17987.1    | MHC                           |
| 1  | HLA-A        | M12377.1    | MHC                           |
| 1  | HLA-B-B*400  | L76934.1    | MHC                           |
| 2  | TH1L         | AK023310.1  | molekulare Funktion unbek.    |
| 2  | SF3B1        | XM_038972.3 | mRNA Splicing                 |
| 2  | PCNP         | NM_020357.1 | Nucleäres Protein             |
| 1  | SLC25A3      | X77337.1    | Phosphatcarrier/Mitochondrion |
| 1  | TRIP1        | XM_041324.1 | Proteolyse                    |
| 1  | USP13        | BC016146.1  | Proteolyse                    |
| 1  | PSMA7        | BC014999.1  | Proteolyse/Proteasom          |
| 7  | <b>TCRB</b>  | X01410      | Rezeptor                      |
| 5  | <b>TCRG</b>  | M30894.1    | Rezeptor                      |
| 4  | <b>CD5</b>   | BC027901.1  | Rezeptor                      |
| 1  | <b>CD6</b>   | AC003689.1  | Rezeptor                      |
| 4  | <b>CD8A</b>  | BC025715.1  | Rezeptor                      |
| 3  | TRBV5-4      | BC028083.1  | Rezeptor                      |
| 1  | FZD8         | AL121749.14 | Rezeptor                      |
| 1  | <b>TRGV9</b> | AF159056.1  | Rezeptor                      |
| 36 | RPS4X        | NM_001007.2 | Ribosomales Protein           |
| 5  | L11          | AF432212.1  | Ribosomales Protein           |
| 4  | RPL3         | BC008003.1  | Ribosomales Protein           |
| 4  | RPLP0        | BC005863.1  | Ribosomales Protein           |
| 4  | RPS12        | NM_001016.2 | Ribosomales Protein           |
| 2  | LAMR1        | NM_002295.2 | Ribosomales Protein           |
| 2  | MRPL3        | NM_018997.1 | Ribosomales Protein           |
| 2  | RPL24        | NM_000986.2 | Ribosomales Protein           |
| 2  | RPS2         | BC032129.1  | Ribosomales Protein           |
| 1  | RPL31        | NM_000993.2 | Ribosomales Protein           |
| 1  | RPL5         | AF113210.1  | Ribosomales Protein           |
| 1  | DDXL         | XM_031276.4 | RNA Helicase                  |
| 10 | PABPC1       | BC023217.1  | RNA Metabolismus              |
| 1  | RNU64        | XM_034464.1 | RNA Metabolismus              |
| 15 | GNAS         | AF493898.1  | Signaltransduktion            |
| 3  | ADRBK1       | XM_040037.3 | Signaltransduktion            |
| 2  | RAC1         | AF498964.1  | Signaltransduktion            |

|    |               |             |                      |
|----|---------------|-------------|----------------------|
| 1  | FYB           | NM_001465.1 | Signaltransduktion   |
| 1  | GNAS1         | AL109840.24 | Signaltransduktion   |
| 1  | LOC90701      | NM_033280.1 | Signaltransduktion   |
| 1  | LY6E          | BC003392.1  | Signaltransduktion   |
| 1  | MAPK8IP3      | AE006639.1  | Signaltransduktion   |
| 1  | PPM1G         | BC022061.1  | Signaltransduktion   |
| 1  | SE20-4        | BC024270.1  | Signaltransduktion   |
| 1  | SMG1          | XM_085436.1 | Signaltransduktion   |
| 1  | STMN1         | XM_002003.4 | Signaltransduktion   |
| 3  | MATR3         | NM_018834.2 | Transkription        |
| 2  | NFKBIA        | AY033600.1  | Transkription        |
| 1  | BM029         | XM_002114.4 | Transkription        |
| 1  | EP400         | NM_015409.2 | Transkription        |
| 2  | TCF6L1        | NM_003201.1 | Transkriptionsfaktor |
| 1  | JUNB          | U20734.1    | Transkriptionsfaktor |
| 1  | MAIL          | NM_031419.1 | Transkriptionsfaktor |
| 11 | <b>EEF1A1</b> | NM_001402.4 | Translation          |
| 4  | <b>EEF2</b>   | NM_001961.2 | Translation          |
| 3  | <b>EEF1G</b>  | BC028179.1  | Translation          |
| 2  | <b>EEF1B2</b> | NM_001959.2 | Translation          |
| 1  | KARS          | BC013246.1  | tRNA Synthetase      |
| 1  | CGI-87        | NM_016030.3 | Unklassifiziert      |
| 1  | LOC55831      | NM_018447.1 | Unklassifiziert      |
| 4  | unknown gene  | AL359681.5  | Unklassifiziert      |
| 4  | unknown gene  | AP001582.4  | Unklassifiziert      |
| 2  | unknown gene  | AC021607.9  | Unklassifiziert      |
| 2  | unknown gene  | AC092653.3  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AC008747.5  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AC012510.8  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AC018889.7  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AC020651.19 | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AC044810.7  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AF018071.1  | Unklassifiziert      |
| 1  | unknown gene  | AP003774.4  | Unklassifiziert      |
| 1  | ISG20         | NM_002201.3 | Zellproliferation    |
| 1  | MBP           | XM_117096.2 | Zellstruktur         |
| 1  | NF2           | AF369657.1  | Zellstruktur         |
| 1  | VIL2          | NM_003379.3 | Zellstruktur         |
| 1  | VIM           | XM_167414.1 | Zellstruktur         |
| 2  | CRI1          | BC024151.1  | Zellzyklus           |
| 5  | ARPC2         | BC000590.1  | Zyoskelett           |
| 2  | AIM1          | AL359292.12 | Zyoskelett           |
| 1  | ACTG1         | BC018861.1  | Zyoskelett           |

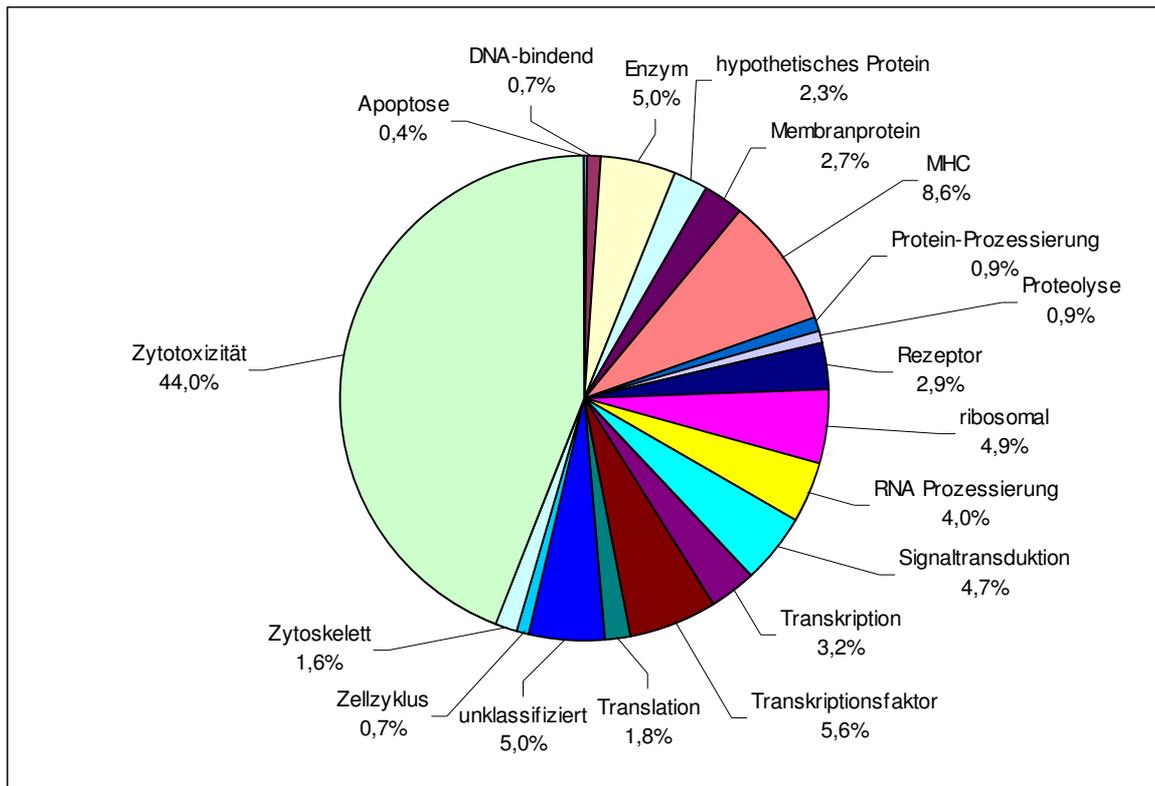


Abb. 4.2.12: NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

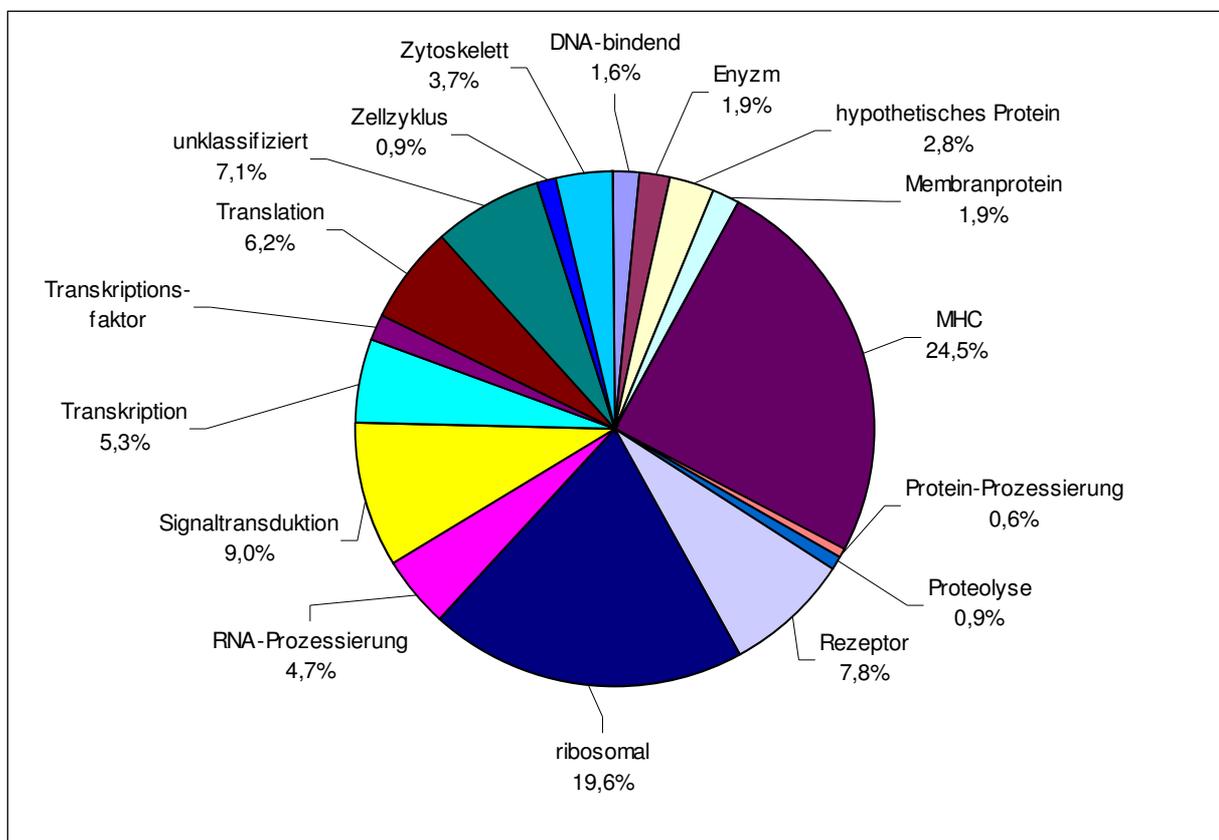


Abb. 4.2.13: CD8<sup>+</sup> T-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

Die Abbildungen 4.2.12 und 4.2.13 zeigen die Verteilung der in den Tabellen aufgeführten Ergebnisse der subtraktiven cDNA-Banken für NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Einige der Klassen sind in beiden Zellpopulationen gleichstark vertreten; hypothetische Proteine, Protein-Prozessierung, Proteolyse, RNA-Prozessierung und Zellzyklus. Annähernd gleich häufig kommen bei beiden DNA-bindende Proteine, Membranproteine, an der Transkription beteiligte Faktoren, unklassifizierte Transkripte und Faktoren des Zytoskeletts vor. Die größten Unterschiede zeigen sich für die Klassen MHC und ribosomale Proteine, die bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen 3 bzw. 5 mal stärker vertreten sind als bei NK-Zellen. An der Translation und Signaltransduktion beteiligte Faktoren kommen ebenfalls bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen häufiger vor als bei NK-Zellen, genauso, wie etwas mehr Transkripte für Rezeptoren gefunden wurden. Stärker in NK-Zellen vertreten sind dagegen Enzyme und Transkriptionsfaktoren, während Faktoren, die an Apoptose und Zytotoxizität beteiligt sind, nur in NK-Zellen und nicht in CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurden.

| Anzahl Klone |                  | Klassifizierung | Anzahl Acc.-Nr. 's |                  |
|--------------|------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| NK           | CD8 <sup>+</sup> |                 | NK                 | CD8 <sup>+</sup> |
| 2            | 0                | Apoptose        | 2                  | 0                |
| 4            | 5                | DNA-bindend     | 2                  | 2                |
| 28           | 6                | Enzym           | 16                 | 3                |
| 13           | 9                | Hyp. Protein    | 8                  | 6                |
| 15           | 6                | Membranprot.    | 9                  | 6                |
| 48           | 79               | MHC             | 4                  | 10               |
| 5            | 2                | Prot.-Proz.     | 3                  | 2                |
| 5            | 3                | Proteolyse      | 3                  | 3                |
| 16           | 25               | Rezeptor        | 7                  | 7                |
| 27           | 63               | Ribosomal       | 7                  | 11               |
| 22           | 15               | RNA-Proz.       | 13                 | 5                |
| 26           | 29               | Signaltransduk. | 9                  | 12               |
| 18           | 17               | Transkription   | 10                 | 6                |
| 31           | 5                | Transkr.faktor  | 11                 | 4                |
| 10           | 20               | Translation     | 2                  | 4                |
| 31           | 23               | Unklassifiziert | 13                 | 14               |
| 4            | 3                | Zellzyklus      | 3                  | 2                |
| 9            | 12               | Zytoskelett     | 3                  | 7                |
| 244          | 0                | Zytotoxizität   | 4                  | 0                |

Tabb. 4.2.3: Verteilung der Klassen auf Klone und Acc.-Nr. in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Tabelle 4.2.3 zeigt, dass die subtraktiven cDNA-Banken für NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich viele Klone für die verschiedenen Klassifizierungen enthalten.

Die Anzahl an Klonen, die einer bestimmten Klassifizierung zugeordnet werden können, setzt sich bei den einzelnen Klassifizierungen und Zellpopulationen aus unterschiedlich vielen verschiedenen Transkripten zusammen. In NK-Zellen z.B. lieferten 244 Klone Sequenzen, die unter die Klasse Zytotoxizität fielen. Diese 244 Sequenzen verteilen sich aber nur auf 4 verschiedene Accession-Nummern, während z.B. die Klasse der Enzyme bei NK-Zellen mit 28 Klonen aus 16 verschiedenen Sequenzen besteht. Besonders viele verschiedene Sequenzen wurden für NK-Zellen für Enzyme gefunden, gefolgt von unklassifizierten Sequenzen und Sequenzen für Faktoren, die an der RNA-Prozessierung, an der Transkription und an der Signaltransduktion beteiligt sind sowie von Sequenzen für Transkriptionsfaktoren und Membranproteine. In CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Variabilität für Sequenzen der Klassifizierung Signaltransduktion nach der Klasse Unklassifiziert am höchsten, gefolgt von den ribosomalen Sequenzen und den Sequenzen für MHC.

#### 4.2.11 Kontrolle der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen: HLA-Typisierung

Da in den Listen der differentiell exprimierten Gene MHC-Gene auftraten, bot sich eine HLA-Typisierung der subtrahierten Proben als eine zusätzliche Kontrolle an. Es wurde die Gesamt-DNA aus den für die Subtraktiven cDNA-Banken verwendeten Blutproben eingesetzt, ohne eine vorherige Isolierung von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierbei bestätigten sich die Ergebnisse der Subtraktion; in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden

|       |      |       |       |       |      |       |      |
|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| A*:   | 01XX | A*:   | ----  | A*:   | 03XX | A*:   | 32XX |
| B*:   | 37XX | B*:   | 55/56 | B*:   | 51XX | B*:   | 57XX |
| C*:   |      | C*:   |       | C*:   |      | C*:   |      |
| DRB1* | 04XX | DRB1* | 10XX  | DRB1* | 03XX | DRB1* | 07XX |
| DRB3* |      | DRB3* |       | DRB3* | XXXX | DRB3* |      |
| DRB4* | XXXX | DRB4* |       | DRB4* | XXXX | DRB4* |      |
| DRB5* |      | DRB5* |       | DRB5* |      | DRB5* |      |
| DQB1* | 03XX | DQB1* | 05XX  | DQB1* | 02XX | DQB1* | 03XX |
| DPB1* |      | DPB1* |       | DPB1* |      | DPB1* |      |

Abb. 4.2.14: HLA-Typisierung für NK 1.Probe.      Abb. 4.2.15: HLA-Typisierung für NK 2.Probe.

|       |      |       |      |       |      |       |      |
|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| A*:   | 01XX | A*:   | 24XX | A*:   | 02XX | A*:   | 11XX |
| B*:   | 08XX | B*:   | ---- | B*:   | 07XX | B*:   | 40XX |
| C*:   |      | C*:   |      | C*:   |      | C*:   |      |
| DRB1* | 15XX | DRB1* | 03XX | DRB1* | 01XX | DRB1* | 04XX |
| DRB3* | XXXX | DRB3* |      | DRB3* |      | DRB3* |      |
| DRB4* |      | DRB4* |      | DRB4* | XXXX | DRB4* |      |
| DRB5* | 01XX | DRB5* |      | DRB5* |      | DRB5* |      |
| DQB1* | 06XX | DQB1* | 02XX | DQB1* | 05XX | DQB1* | 03XX |
| DPB1* |      | DPB1* |      | DPB1* |      | DPB1* |      |

Abb. 4.2.16: HLA-Typisierung für CD8<sup>+</sup> 1.Probe. Abb. 4.2.17: HLA-Typisierung für CD8<sup>+</sup> 2.Probe.

Sequenzen für HLA-B\*08, für HLA-B\*40 und für HLA-DRB5 gefunden, die nach Typisierung nur in dieser Probe, nicht aber in der NK-Zell-Probe vorhanden waren. Für die NK-Zellen konnte durch die Sequenzierung der differentiell exprimierten Sequenzen keine genauere Bestimmung durchgeführt werden, es wurden nicht näher bestimmbare Sequenzen für HLA-DRA und HLA-DRB1 gefunden.

#### 4.2.12 NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen: Genexpressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Array

Zur Überprüfung und Ergänzung der durchgeführten Subtraktion wurde dasselbe Ausgangsmaterial für eine Analyse mittels Oligonukleotid-Array eingesetzt. Auf diesem Microarray befinden sich Oligonukleotide, die 17.000 menschliche Gene repräsentieren. Es wurde cDNA von NK-Zellen und von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Hybridisierung und Auswertung wurde von Frau Sandra Weinhold durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA-Subtraktion, wegen des großen Umfangs kann aber nur ein Teil der Ergebnisse der Microarray-Analyse in Tabelle 4.2.4 gezeigt werden. Die Ratio gibt das Signalverhältnis von NK- zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen, bzw. von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu NK-Zellen an, also die Überexpression des jeweiligen Faktors in NK- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

| <b>Gensymbol<br/>cDNA-Subtraktion</b> | <b>Acc.-Nr.<br/>Microarray</b> | <b>Ratio<br/>Microarray</b>   |
|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| <b>in NK-Zellen</b>                   |                                | <b>Expression in NK-Zellen<br/>gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b> |
| RREB1                                 | D49835                         | 1.02  |
| ZNF 145 (PLZF)                        | Z19002                         | 1.33  |
| ZNF211                                | U38904                         | 0.00  |
| ZNF 236                               | AK000847                       | 1.48  |
| EIF2B5                                | U23028                         | 1.226   |
| EIF2S3                                | L19616                         | 5.8   |
| SMARCF1                               | AB001895                       | 3.1   |
| TCEB1                                 | L34587                         | 0.67  |
| Granulysin                            | NM_0123483                     | 1.7   |
|                                       |                                |   |
| <b>in CD8<sup>+</sup> T-Zellen</b>    |                                | <b>Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen<br/>gegenüber NK-Zellen</b> |
| EEF1A1                                | X63526                         | 2.44  |
| EEF2                                  | X16869                         | 1.47  |
| EEF1G                                 | X60489                         | 1.64  |
| EEF1B2                                | Z11692                         | 1.57  |

Tab. 4.2.4: Expressionsanalyse einiger differentiell exprimierter Gene aus NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Microarray.

#### **4.2.13 NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen: Expressionsanalyse der differentiell exprimierten Sequenzen aus den Subtraktiven cDNA-Banken mit Real-time PCR**

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Real-time PCR sind in den Abbildungen 4.2.19 bis 4.2.22 dargestellt. Darüber hinaus wurde für alle Real-time PCR-Experimente eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um das Vorhandensein von Primer-Dimeren und Nebenprodukten auszuschließen. Abbildung 4.2.19 zeigt die Expression von Faktoren, die in der subtraktiven cDNA-Bank für NK-Zellen gefunden wurden. Es handelt sich um den "HMG box transcription factor BBX" (*BBX*), einen Transkriptionsfaktor, das "nuclear receptor coactivator 6 interacting protein" (*NCOA6IP*) und das "transcription elongation factor

B (SIII), polypeptide 1" (*TCEB1*, *ElonginC*), die beide eine Rolle bei der Transkription spielen und den "SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin subfamily F member 1" (*SMARCF1*), der die Transkription verschiedener Gene durch Veränderung des Chromatinstatus reguliert.

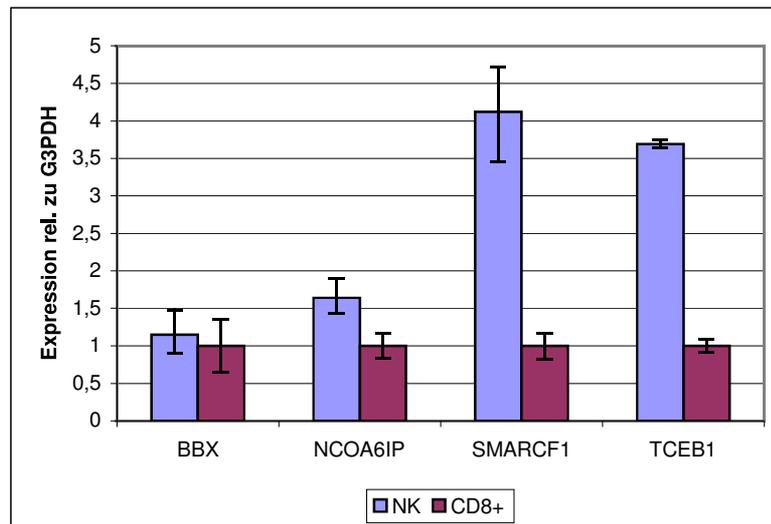


Abb. 4.2.19: Expression verschiedener Gene in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Alle vier Faktoren sind in NK-Zellen stärker exprimiert als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wodurch die differentielle Expression bestätigt wird. Bei *SMARCF1* und *TCEB1* ist der Unterschied besonders deutlich; *SMARCF1* ist in NK-Zellen etwa 4 mal stärker exprimiert als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen und *TCEB1* etwa 3,5 mal. Für *BBX* konnte nur eine leicht verstärkte Expression gemessen werden und für *NCOA6IP* eine etwa 1,5-fache.

In Abbildung 4.2.20 ist die Expression von zwei Genen gezeigt, die beide an der Translation beteiligt sind und die ebenfalls in der subtraktiven cDNA-Bank für NK-Zellen gefunden wurden. Der "translation initiationfactor eIF-2B subunit epsilon" (*EIF2B5*) und der "eucaryotic translation initiationfactor 2 subunit 3 gamma" (*EIF2S3*) sind beide in NK-Zellen stärker exprimiert als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wobei der Unterschied bei ersterem nur sehr gering ist, während die Expression von *EIF2S3* in NK-Zellen fast 7 mal höher ist als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

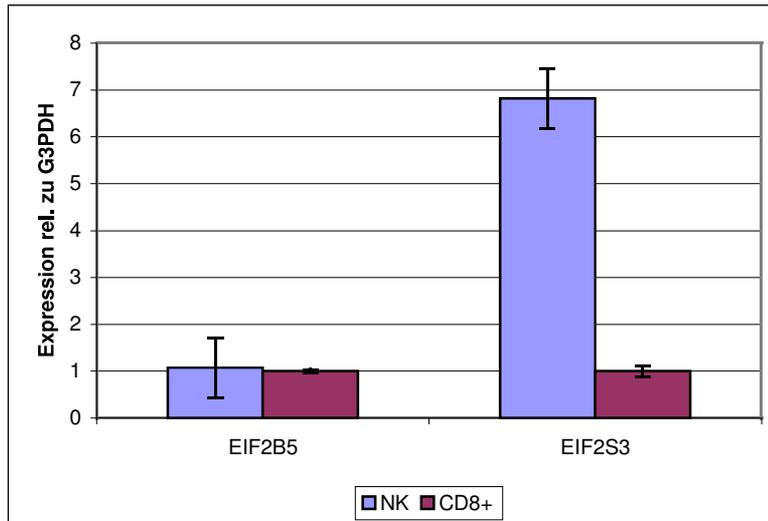


Abb. 4.2.20: Expression von *EIF2B5* und *EIF2S3* in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

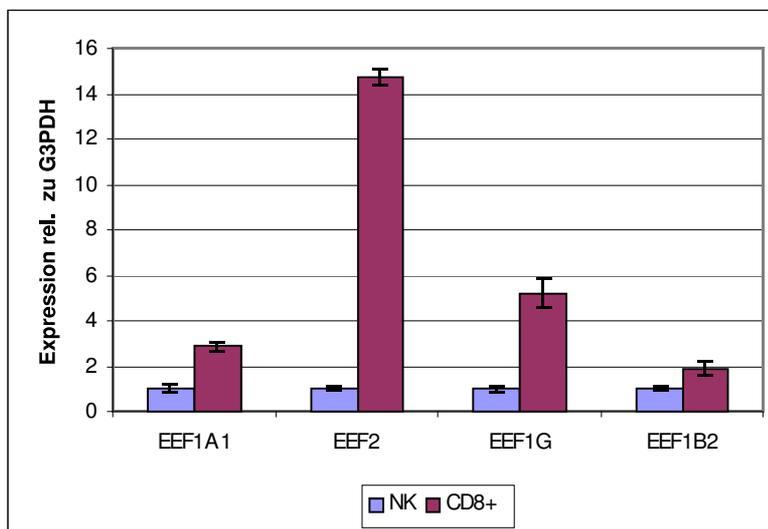


Abb. 4.2.21: Expression verschiedener Gene in CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber NK-Zellen.

Die Expression von Faktoren, die in CD8<sup>+</sup> T-Zellen differentiell exprimiert sind und die an der Translation beteiligt sind, ist in Abbildung 4.2.21 dargestellt. Der "Elongation factor 1-alpha 1" (*EEF1A1*), "Elongation factor 2" (*EEF2*), "Elongation factor 1-gamma" (*EEF1G*) und der "Elongation factor 1-beta" (*EEF1B2*) sind Faktoren, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der Bindung zwischen aminoacyl-tRNA und Ribosom, bzw. Ablösung des entstandenen Proteins, spielen. *EEF1* besteht aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Wie aufgrund der Ergebnisse der subtraktiven cDNA-Bank zu erwarten, ist die Expression aller vier Gene in CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum Teil sehr deutlich höher als in NK-Zellen. Die größten Unterschiede zeigen sich bei *EEF2*, mit über 14 mal stärkerer und bei *EEF1G* mit

etwa 5 mal stärkerer Expression, während die beiden anderen Faktoren mit etwa 3 mal (*EEF1A1*) und knapp 2 mal (*EEF1B2*) höherer Expression zwar deutlich über der Expression in NK-Zellen liegen aber weniger auffällig sind.

In Abbildung 4.2.22 ist die Expression von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die in NK-Zellen differenziell exprimiert sind, im Vergleich zur Expression in CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt: Das "RAS-responsive element-binding protein 1" (*RREB1*), das "Zinc finger protein 211" (*ZNF211*) und das "Zinc finger protein 236" (*ZNF236*) sowie das "Zinc finger and BTB domain-containing protein 16" (*PLZF*, *ZNF145*, *ZBTB16*), die alle als DNA-Bindemotiv C2H2-Zinkfinger besitzen. Während *RREB1*, *ZNF211* und *ZNF236* jeweils etwa doppelt so stark in NK-Zellen exprimiert werden, wie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ist die Expression von *PLZF* etwa um das 29-fache höher.

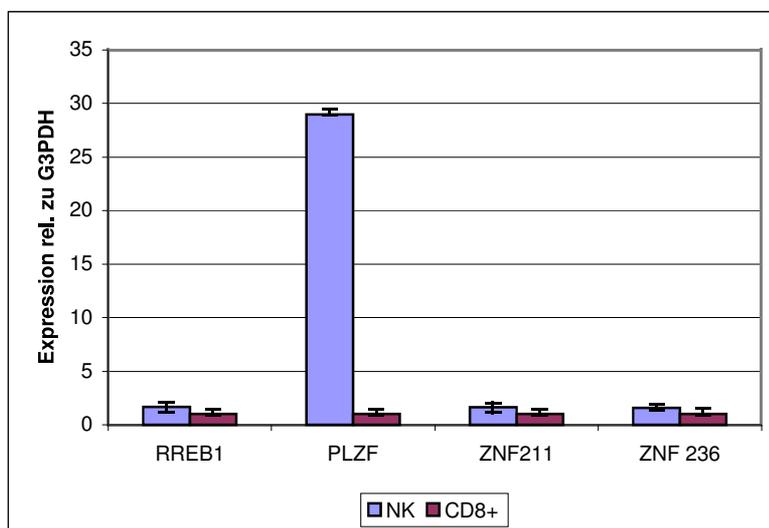


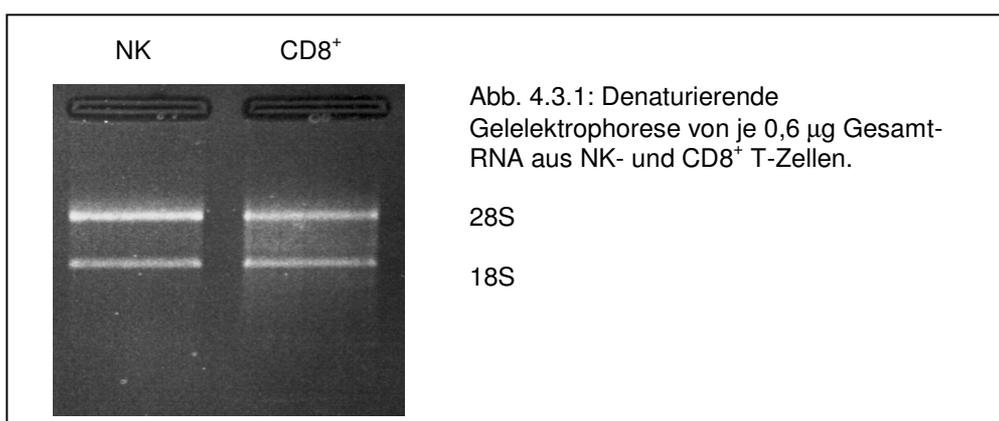
Abb. 4.2.22: Expression von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

## 4.3 Kultivierte NK-Zellen (IL-2)

### 4.3.1 RNA-Isolierung und Denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA

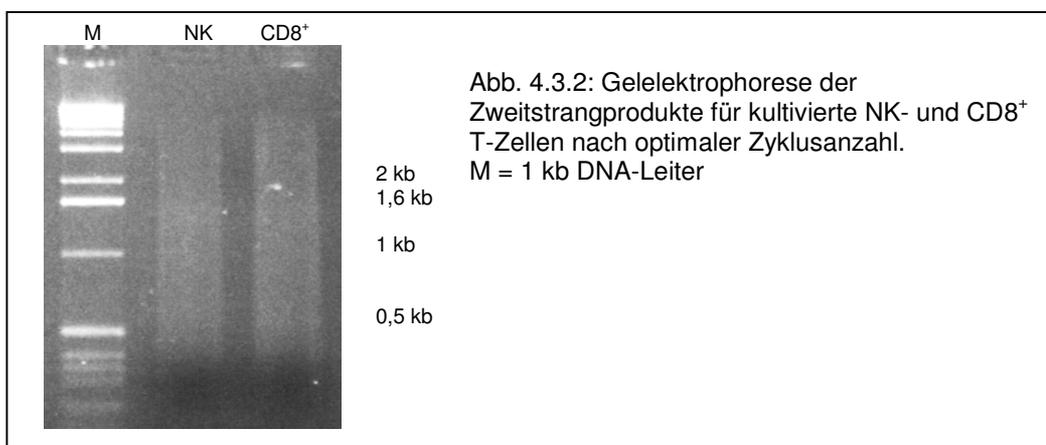
Für verschiedene Experimente werden NK-Zellen kultiviert, damit einerseits ausreichend Zellmaterial desselben Ursprungs zur Verfügung steht und andererseits die Expression bestimmter Faktoren im zeitlichen Verlauf, bzw. bei unterschiedlichen Bedingungen beobachtet werden kann. Üblicherweise erfolgt die Kultivierung von NK-Zellen unter Zugabe von IL-2, wodurch die Zellen zur Proliferation angeregt werden und welches zusätzlich die Zytotoxizität fördert (Warren et al., 1993, Bonnema et al., 1994). Durch Herstellung einer weiteren cDNA-Bank sollte untersucht werden, ob sich das Expressionsprofil der NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Kultivierung verändert.

Aus in NK-Medium (siehe 3.1.5) kultivierten NK-Zellen sowie aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus humanem peripherem Blut wurde mittels RNeasy (Qiagen) Gesamt-RNA isoliert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt, die Integrität und die Effizienz des DNase-Verdau wurden durch eine Gelelektrophorese überprüft. Die Gelelektrophorese zeigt, dass die RNA nicht degradiert ist und dass keine Verunreinigung durch genomische DNA vorhanden ist (Abb. 4.3.1).



### 4.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das SMART-System verwendet. Es wurden je 0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In einer semiquantitativen PCR wurde die optimale Zyklusanzahl bestimmt. Für NK-Zellen wurde die optimale Zyklusanzahl auf 22 Zyklen bestimmt, für CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf 21 Zyklen. Abbildung 4.3.2 zeigt, dass nach optimaler Zyklusanzahl für NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gleichviel PCR-Produkt vorhanden war.

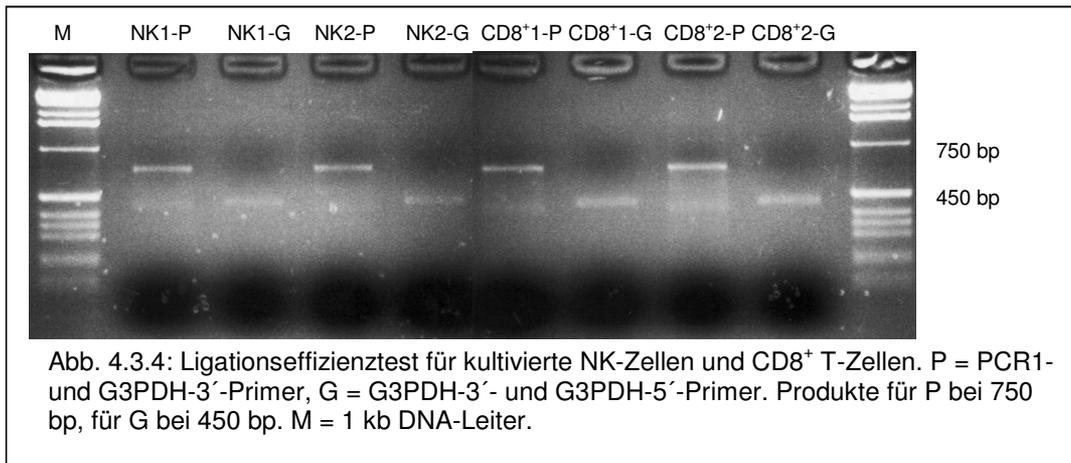


### 4.3.3 Kontrolle des *RsaI*-Verdau

Nach einer Reinigung der Zweitstrangprodukte mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) erfolgte ein Restriktionsverdau mit *RsaI*. Anschließend wurden die Proben vor und nach Verdau auf einem Agarosegel analysiert, um die Effizienz des Restriktionsverdau zu kontrollieren. Hierbei zeigte sich, dass der Restriktionsverdau erfolgreich war, die verdauten Proben enthielten wesentlich kürzere Fragmente (2 bis 0,1 kb gegenüber 10 bis 0,5 kb vor Verdau).

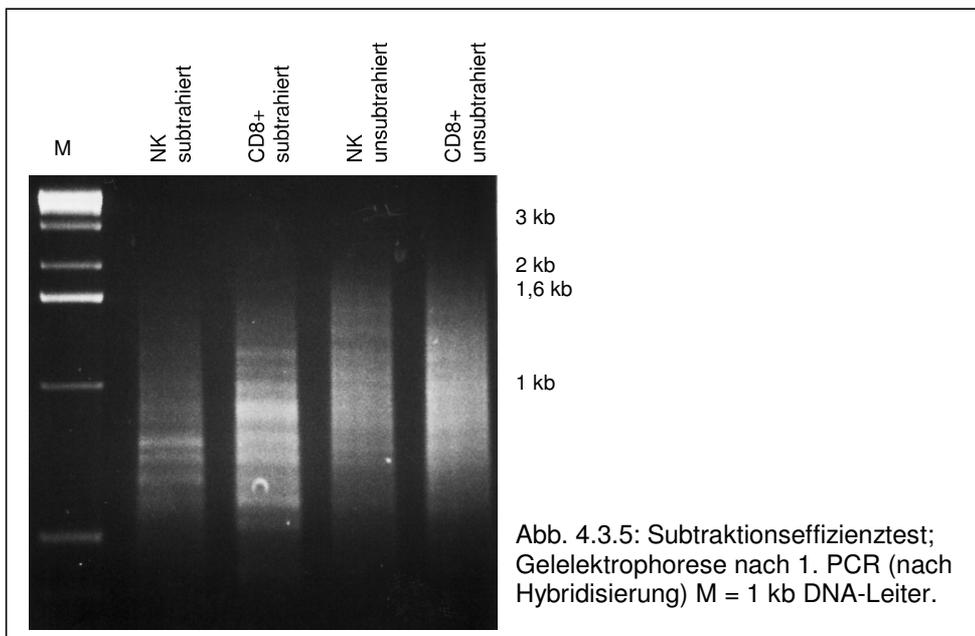
### 4.3.4 Ligationseffizienztest

Nach Reinigung der *RsaI* verdauten cDNA mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) wurde die Adaptorligation durchgeführt. Zur Kontrolle der Effizienz der Ligation wurde der Ligationseffizienztest durchgeführt. Die deutlichen Banden bei 750 bp bestätigen eine hohe Effizienz der Adaptorligation (Abbildung 4.3.4).



#### 4.3.5 Subtraktionseffizienztest

Nach der Hybridisierung wurde eine 1. und eine 2. PCR durchgeführt und die Produkte auf einem Agarosegel analysiert. Abbildung 4.3.5 zeigt die Produkte nach der 1. PCR. Für die subtrahierten Proben ist der zu erwartende Schmier zwischen 2 und 0,2 kb mit mehreren distinkten Banden zu sehen.



#### 4.3.6 Subtraktionseffizienzkontrolle

Anstelle der semiquantitativen PCR zur Kontrolle der Subtraktionseffizienz, bei der ein Rückgang des *G3PDH*-Transkriptes in der subtrahierten Probe gezeigt werden soll, wurde eine Real-time PCR durchgeführt. Es wurden Primer für *G3PDH* und Granulysin (*GNLY*) verwendet, da durch die cDNA-Bank aus frisch isolierten NK-Zellen bereits bekannt war, dass NK-Zellen deutlich mehr *GNLY* enthalten, als CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Somit sollte in der subtrahierten Probe die Transkriptmenge an *GNLY* höher sein als in der unsubtrahierten Probe. Es wurde jeweils der  $\Delta\text{Ct}$  Wert für *GNLY* für die subtrahierte und die unsubtrahierte Probe berechnet und anschließend  $\Delta\Delta\text{Ct}$  aus den Werten für NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet. Abbildung 4.3.6 zeigt deutlich eine Anreicherung von *GNLY* in der subtrahierten NK-Probe, was auf eine sehr effiziente Subtraktion schließen lässt.

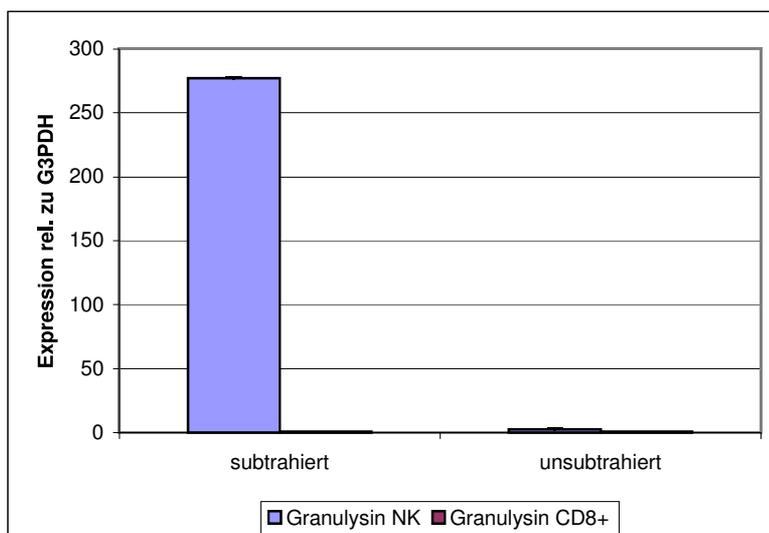


Abb. 4.3.6: Subtraktionseffizienzkontrolle mit *GNLY*. Real-time PCR mit subtrahierten und unsubtrahierten Proben.

#### 4.3.7 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene

Die Produkte aus der 1. PCR nach der Hybridisierung wurden nach dem Subtraktionseffizienztest in den Vektor pCR2.1 kloniert. Nach Transfektion in *E.coli* TOP10F<sup>'</sup> wurden positive Klone ausgewählt, die Plasmid-DNA daraus isoliert und eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit BLAST analysiert.

Tab. 4.3.1: Differenziell exprimierte Gene in kultivierten NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

| Häufigkeit | Gensymbol     | Acc. No.    | Klassifizierung        |
|------------|---------------|-------------|------------------------|
| 2          | FTL           | BC008439.1  | (Eisen-)Stoffwechsel   |
| 5          | B2M           | NM_004048.1 | Antigenpräsentation    |
| 3          | IMAGE:4041403 | BC013390.1  | Enzym                  |
| 3          | MARK3         | AF159295.1  | Enzym/Kinase           |
| 3          | C12orf2       | BC050609.1  | Hypothetisches Protein |
| 1          | KPNB1         | NM_002265.4 | Proteintransport       |
| 1          | KLRB1         | NM_002258.1 | Rezeptor               |
| 2          | unbekannt     | AF397158.1  | Ribosomales Protein    |
| 1          | 18S           | X03205.1    | Ribosomales Protein    |
| 1          | CSNK1A1       | BC040473.1  | Signaltransduktion     |
| 1          | GNAS          | NM_000516.3 | Signaltransduktion     |
| 1          | ZNF147        | BC016924.1  | Transkriptionsfaktor   |
| 1          | PRO1073       | BC025986.1  | Unklassifiziert        |
| 3          | GNLY          | NM_006433.2 | Zytotoxizität          |
| 1          | GNLY          | X54101.1    | Zytotoxizität          |

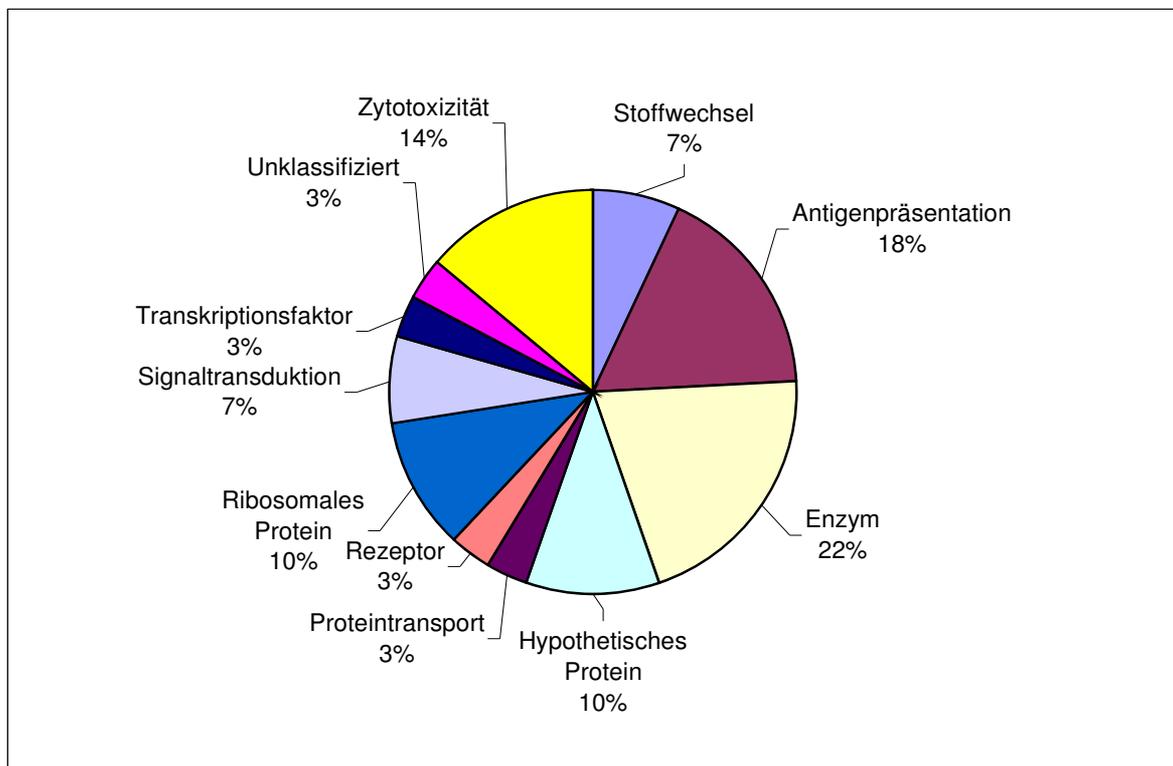


Abb. 4.3.7: Kultivierte NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

Die Tab. 4.3.1 zeigt die Sequenzen, die in kultivierten NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenziell exprimiert sind. Der Vergleich mit den in frisch isolierten NK-Zellen exprimierten Sequenzen zeigt, dass Granulysin (*GNLY*) in beiden Zellpopulationen häufig zu finden ist. Die Untersuchung mit Real-time PCR konnte diese Beobachtung sowohl für frisch isolierte als auch für kultivierte NK-Zellen

bestätigen. Das Transkript für den Rezeptor *KLRB1* wurde ebenfalls in frisch aus peripherem Blut isolierten NK-Zellen gefunden. Somit bestätigt sich einerseits die Qualität dieser subtraktiven cDNA-Bank, andererseits zeigt sich, dass die Expression eines für die Zytotoxizität wichtigen Faktors (*GNLY*) auch bei kultivierten NK-Zellen deutlich höher ist als bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Sequenzen für die leichte Kette des Ferritins (FTL), das am Eisenstoffwechsel beteiligt ist und für Beta-2-Mikroglobulin (B2M), das bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielt, finden sich dagegen nicht in frisch isolierten NK-Zellen, sondern in NK3.3-Zellen.

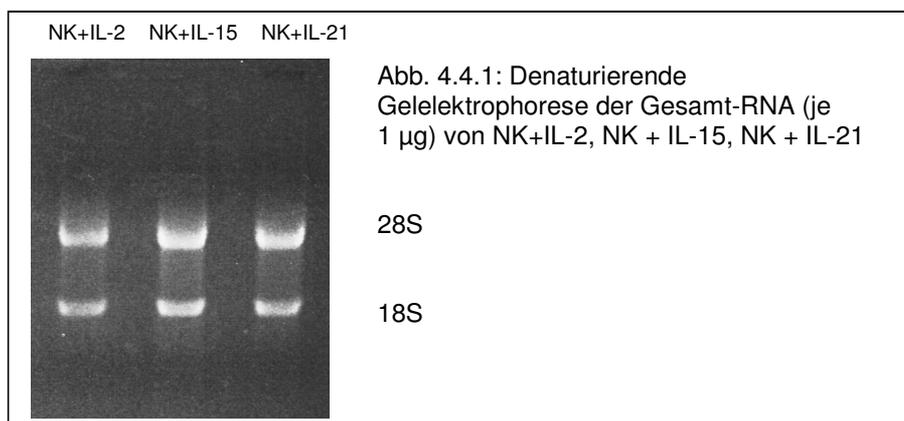
## 4.4 Kultivierte NK-Zellen (IL-15 und IL-21)

Nach der subtraktiven cDNA-Bank aus IL-2-kultivierten NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden weitere subtraktive cDNA-Banken aus mit IL-15 und mit IL-21 kultivierten NK-Zellen hergestellt. Während IL-2 vor allem für die Expansion von NK-Zellen verwendet wird, dient IL-15 zur Förderung der Zytotoxizität (Carson et al., 1994) und IL-21 wird für die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen verwendet, um aus diesen NK-Zellen zu generieren (Sivori et al., 2003). Für die cDNA-Banken wurden Subtraktionen von NK-Zellen+IL-2 versus NK-Zellen+IL-15 und umgekehrt, sowie NK-Zellen+IL-2 versus NK-Zellen+IL-21 und umgekehrt durchgeführt. Auf diese Weise sollte das Expressionsmuster der unterschiedlich kultivierten NK-Zellen untersucht werden.

### 4.4.1 RNA Isolierung und denaturierende Gelelektrophorese der Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit RNeasy (Qiagen) durchgeführt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Es wurden je 1 µg Gesamt-RNA auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, um die Effektivität des DNase-Verdau und die Integrität der RNA zu kontrollieren. Wie Abbildung 4.4.1 zeigt, war zum einen der DNase-Verdau erfolgreich, es sind keine Banden über der 28S rRNA-Bande zu sehen, zum anderen war die Gesamt-RNA intakt, es sind die beiden distinkten Banden für die 18 und 28S rRNA zu sehen, dazwischen zeigen sich keine kurzen Fragmente als Schmier, die durch Degradation entstehen würden.



#### 4.4.2 cDNA-Synthese

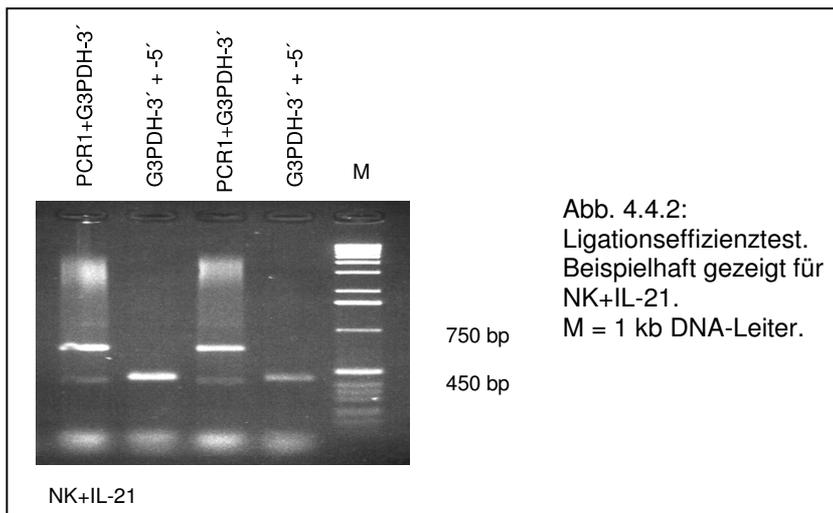
Wie schon in den vorausgegangenen Subtraktionen wurde als Ausgangsmaterial für die cDNA-Bank Gesamt-RNA verwendet, da aufgrund der geringen Mengen keine mRNA Isolierung durchgeführt werden konnte. Es wurde die ebenfalls wieder die SMART™ Technologie angewendet. Für die Erststrangsynthese wurden 0,5 µg mRNA aus der "control mRNA" (Clontech) und je 1 µg Gesamt-RNA aus NK+IL-2, NK+IL-15 und NK+IL-21 eingesetzt. Für die Zweitstrangsynthese wurde eine Optimierung der PCR mittels semiquantitativer PCR durchgeführt. Die optimale Zyklusanzahl betrug 18 Zyklen. Danach waren alle Proben gleich stark amplifiziert und konnten für die weitere Subtraktion verwendet werden.

#### 4.4.3 Kontrolle des *Rsa*I-Verdaus

Nach dem *Rsa*I-Verdau wurden die Proben vor und nach Verdau auf einem Agarosegel analysiert. Die unverdauten Proben zeigten einen Schmier 0,5 – 10 kb, während die verdauten Proben als Schmier von 0,1 – 2 kb zu sehen waren. Somit war der Restriktionsverdau erfolgreich.

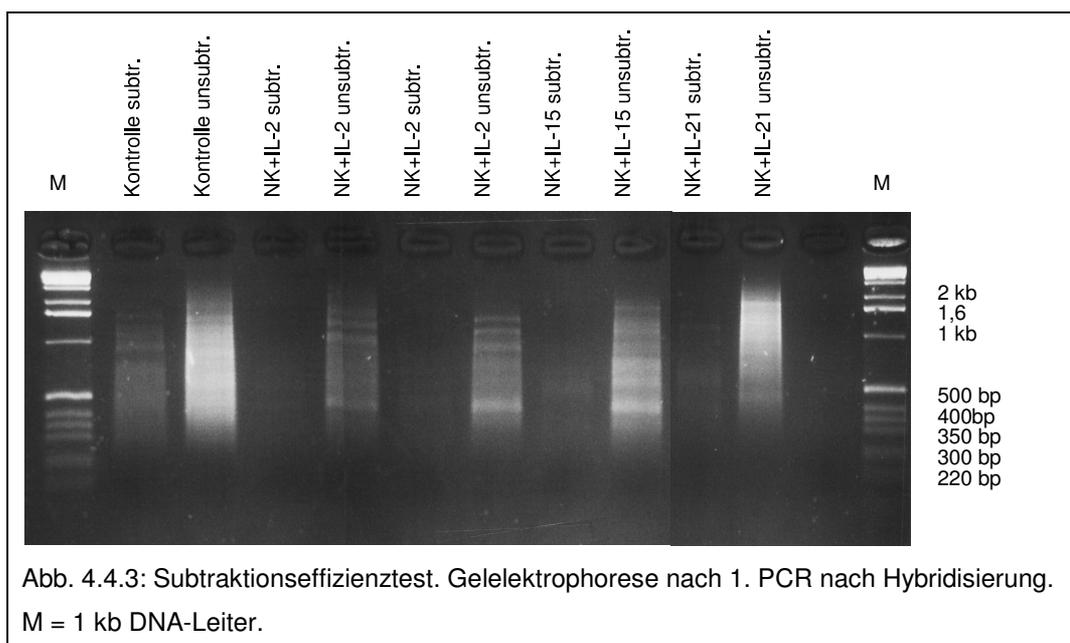
#### 4.4.4 Ligationseffizienztest

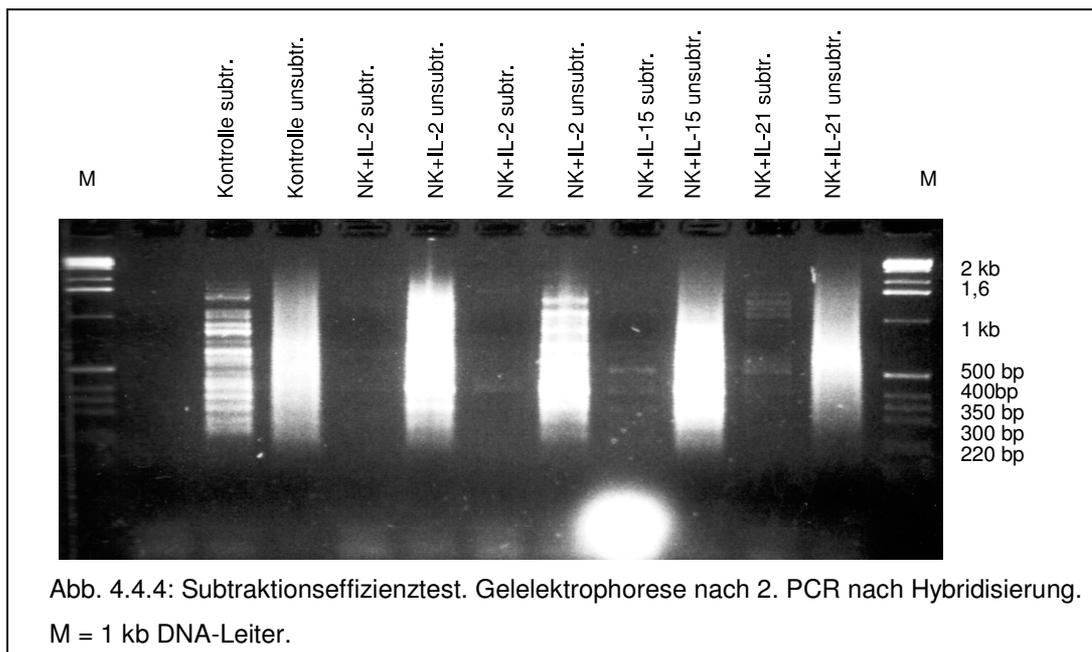
In Abbildung 4.4.2 ist der Ligationseffizienztest gezeigt (NK-Zellen + IL-21 als Beispiel). Hierzu wurde eine PCR mit G3PDH-3' und Primer 1 (Produkt 750 bp) und mit G3PDH-3' und G3PDH-5' (Produkt 450 bp) mit jeder Probe zweimal (mit Adaptor1 und mit Adaptor2R ligiert) durchgeführt. Wenn die Bande bei 750 bp ¼ der Intensität der Bande bei 450 bp aufweist, sind mindestens 25% der cDNA mit Adaptoren ligiert. Da die obere Bande bei allen Proben stärker als die untere Bande ist, wurde die Adaptorligation als effizient betrachtet. Die untere Bande ist bei den NK+IL-2 und NK+IL-15 relativ schwach, war aber vorhanden. Da sie nur als Vergleich für die Stärke der oberen Bande dient und auch in dieser Form in der Kontrolle ("control mRNA"-Probe) vorhanden war, wurden die Proben für die weitere Subtraktion verwendet.



#### 4.4.5 Subtraktionseffizienzttest

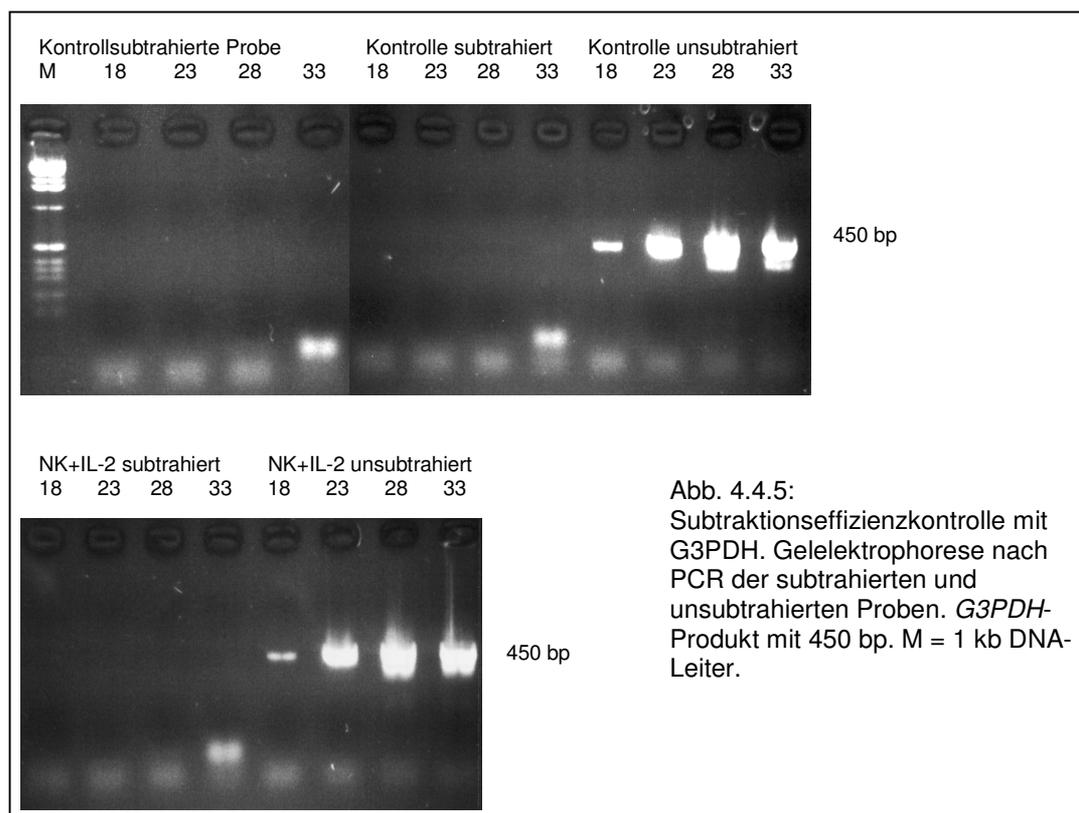
Die Produkte der ersten und zweiten PCR nach Hybridisierung wurden zur Kontrolle der Subtraktionseffizienz auf einem Agarosegel analysiert. Bei erfolgreicher Subtraktion sollten in der subtrahierten Kontrolle die  $\phi$ X174/*HaeIII*-Fragmente sichtbar werden. Abbildung 4.4.3 und 4.4.4 zeigen, dass die Subtraktion effizient war, da in der subtrahierten Kontrolle die  $\phi$ X174/*HaeIII*-Fragmente zu sehen sind.





#### 4.4.6 Subtraktionseffizienzkontrolle mit G3PDH

Als abschließende Kontrolle der fertigen Subtraktion wurde eine PCR der subtrahierten und der unsubtrahierten cDNA mit G3PDH-Primern durchgeführt, um zu überprüfen, ob dieses stark exprimierte Gen durch die subtraktive Hybridisierung "herausgefiltert" werden konnte, da als Ergebnis hauptsächlich seltene und differentiell exprimierte Sequenzen erwartet werden. Abbildung 4.4.5 zeigt die Agarosegelanalyse der semiquantitativen PCR beispielhaft für die Kontrolle (aus mitgelieferter RNA hergestellt) und die NK+IL-2. In der Kontrolle ("control mRNA"-Probe) ist in der subtrahierten Probe kein Produkt zu sehen, während es in der unsubtrahierten Probe schon bei 18 Zyklen vorhanden ist. Ebenso ist es in den NK+IL-2. Da in keiner der subtrahierten Proben ein PCR-Produkt vorhanden war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Subtraktion erfolgreich war und häufige, nicht differentielle Sequenzen durch die subtraktive Hybridisierung größtenteils herausgefiltert worden waren.



#### 4.4.7 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene

Wie bei den übrigen subtraktiven cDNA-Banken wurden die positiven Klone sequenziert und die Sequenzen mit dem BLAST-Programm analysiert.

Für die NK+IL-2 minus NK+IL-15 wurden 143 Inserts sequenziert, von denen 130 ausgewertet werden konnten (Tab. 4.4.1). Für NK+IL-15 minus NK+IL-2 wurden 169 Inserts sequenziert, von denen 124 ausgewertet werden konnten (Tab. 4.4.2). Für die NK+IL-2 minus NK+IL-21 wurden 155 Inserts sequenziert, von denen 113 ausgewertet werden konnten (Tab. 4.4.3). Und für NK+IL-21 minus NK+IL-2 wurden 126 Inserts sequenziert, von denen 52 ausgewertet werden konnten (Tab. 4.4.4).

Tab. 4.4.1: NK+IL-2 nach Subtraktion von NK+IL-15 (NK+IL-2–NK+IL-15).

| Häufigkeit | Gensymbol | Acc.-Nr.    | Klassifizierung    |
|------------|-----------|-------------|--------------------|
| 1          | PTMA      | BC022433.1  | Apoptose           |
| 12         | MDM2      | AF144029.1  | Apoptoseinhibition |
| 1          | OFD1      | NM_003611.1 | Differenzierung    |
| 7          | PIK3R1    | NM_181523.1 | Enzym              |
| 1          | FDFT1     | AK098682.1  | Enzym              |
| 1          | AKR1B1    | AF032455.1  | Enzym/Reduktase    |

|    |            |             |                             |
|----|------------|-------------|-----------------------------|
| 1  | H2AFZ      | BC018002.1  | Genexpression               |
| 1  | H3F3A      | BC038989.1  | Genexpression               |
| 5  | FLJ30656   | BC044587.1  | Hypothetisches Protein      |
| 1  | KIAA0247   | NM_014734.1 | Hypothetisches Protein      |
| 1  | FLJ11220   | NM_018364.1 | Hypothetisches Protein      |
| 2  | ANKT       | BC012887.1  | Kernprotein                 |
| 1  | DR1        | AL137159.7  | Kernprotein                 |
| 1  | HLA-DRA    | V00528.1    | MHC                         |
| 1  | ERO1L      | AK024224.1  | Proteinfaltung              |
| 1  | NACA       | AY034001.1  | Proteinsynthese             |
| 3  | RPL35      | BC000348.1  | Ribosomales Protein         |
| 1  | RPS12      | BC017321.2  | Ribosomales Protein         |
| 1  | RPS3       | BC034149.1  | Ribosomales Protein         |
| 1  | RPL11      | NM_000975.2 | Ribosomales Protein         |
| 1  | RPL23      | NM_000978.2 | Ribosomales Protein         |
| 2  | RPS21      | NM_001024.2 | Ribosomales Protein         |
| 1  | RPS25      | NM_001028.2 | Ribosomales Protein         |
| 1  | NPM1       | BC016768.1  | Ribosome assembly           |
| 1  | DAZAP2     | BC007900.2  | RNA bindend                 |
| 1  | LRRFIP1    | NM_004735.1 | RNA bindend                 |
| 1  | C6orf111   | AF314185.1  | RNA Splicing                |
| 26 | HNRPDL     | BC007392.2  | RNA Splicing                |
| 2  | SFRS4      | NM_005626.3 | RNA Splicing                |
| 2  | PIK3CG     | AC005018.2  | Signaltransduktion          |
| 1  | YWHAB      | NM_139323.2 | Signaltransduktion          |
| 1  | YWHAZ      | NM_145690.1 | Signaltransduktion          |
| 1  | AKAP9      | NM_147185.1 | Signaltransduktion          |
| 20 | NCOA1      | NM_147223.2 | Transkription               |
| 7  | ZNF236     | AK000847.1  | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | BHLHB2     | NM_003670.1 | Transkriptionsfaktor        |
| 2  | ZNF403     | NM_024835.1 | Transkriptionsfaktor        |
| 3  | PAX3/NCOA1 | AY633656.1  | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | EEF1A1     | BC057391.1  | Translation                 |
| 1  | VAPA       | AK000918.1  | Transport/Vesikeltransport  |
| 1  | CDK6       | AY128534.1  | Zellzyklus                  |
| 1  | CCND2      | NM_001759.2 | Zellzyklus                  |
| 1  | CAPZA1     | BC000144.1  | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 7  | GNLY       | NM_012483.1 | Zytotoxizität               |

Tab. 4.4.2: NK+IL-2 nach Subtraktion von NK+IL-21 (NK+IL-2–NK+IL-21).

| Häufigkeit | Gensymbol | Acc.-Nr.    | Klassifizierung        |
|------------|-----------|-------------|------------------------|
| 2          | MDM2      | AF144029.1  | Apoptoseinhibition     |
| 9          | LDHA      | NM_005566.1 | Enzym                  |
| 1          | FLJ22127  | BC009323.2  | Hypothetisches Protein |
| 1          | FLJ30656  | BC016791.2  | Hypothetisches Protein |
| 1          | PRO2730   | BC018941.1  | Hypothetisches Protein |
| 1          | HSPC148   | NM_016403.1 | Hypothetisches Protein |
| 7          | MSTP107   | AF173977.1  | Hypothetisches Protein |
| 14         | INM04     | AY194294.1  | Nucleäres Protein      |

|    |          |             |                     |
|----|----------|-------------|---------------------|
| 2  | RPS20    | NM_001023.2 | Ribosomales Protein |
| 19 | HNRPDL   | BC007392.2  | RNA-Prozessierung   |
| 4  | HIST1H4C | AY128656.1  | Transkription       |
| 25 | NFIL3    | NM_005384.2 | Transkription       |
| 1  | POLR2G   | NM_002696.1 | Transkription       |
| 1  | SARS     | BC009390.2  | tRNA Prozessierung  |
| 20 | CCNI     | AY207372.1  | Zellzyklus          |
| 5  | GNLY     | NM_012483.1 | Zytotoxizität       |

Tab. 4.4.3: NK+IL-15 nach Subtraktion von NK+IL-2.

| Häufigkeit | Gensymbol     | Acc.-Nr.    | Klassifizierung           |
|------------|---------------|-------------|---------------------------|
| 7          | B2M           | AY187687.1  | Antigenpräsentation       |
| 1          | MDM2          | AF144029.1  | Apoptoseinhibition        |
| 2          | HSPE1         | NM_002157.1 | Chaperonin                |
| 2          | HELLS         | AK022928.1  | DNA bindend               |
| 1          | HMGB2         | BC001063.2  | DNA bindend               |
| 3          | NUCKS         | NM_022731.1 | DNA bindend               |
| 1          | IMAGE:4041403 | BC013390.1  | Enzym                     |
| 2          | PPP1CB        | BX647970.1  | Enzym/Dephosphorylase     |
| 2          | PAFAH1B2      | BC010009.2  | Enzym/Hydrolase           |
| 1          | DDOST         | NM_005216.3 | Enzym/Transferase         |
| 5          | H2AZ          | BC020936.1  | Genexpression             |
| 1          | HIST1H4F      | BC054014.1  | Genexpression             |
| 1          | ELD/OSA1      | AL591545.6  | Genexpression             |
| 2          | DKFZp686G052  | XM_300559.1 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | DKFZp761J139  | BC014841.1  | Hypothetisches Protein    |
| 1          | LOC134218     | NM_194283   | Hypothetisches Protein    |
| 1          | LOC221405     | XM_168138.1 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | DKFZp686G052  | XM_350875.1 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | C12ORF2       | BC050609.1  | Hypothetisches Protein    |
| 1          | C9orf5        | NM_032012.1 | Integrales Membranprotein |
| 2          | AEBP2         | NM_153207.2 | Kernprotein               |
| 1          | SEMA4D        | BC054500.1  | Membranprotein            |
| 1          | RAMP4         | AK125413.1  | Membranprotein            |
| 1          | MYL6          | NM_079423.1 | Motorprotein              |
| 3          | PSME1         | BC007503.2  | Proteasom                 |
| 1          | PSMA6         | BC022354.1  | Proteasom                 |
| 1          | PSMA7         | BT007165.1  | Proteasom                 |
| 1          | PSMA5         | NM_002790.2 | Proteasom                 |
| 1          | ERO1L         | AK024224.1  | Proteinfaltung            |
| 1          | PFDN5         | NM_145897.1 | Proteinfaltung            |
| 1          | PRKCH         | BC037268.1  | Proteinkinase             |
| 1          | PDE4DIP       | NM_014644   | Proteintransport          |
| 1          | PRDX2         | BC039428.1  | Redox Regulation          |
| 7          | RPL6          | BC032299.1  | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPS4X         | BC007308.1  | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPL35         | BC010919.1  | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPL10         | BC026276.1  | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPL9          | BC031906.1  | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPL23         | NM_000978.2 | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPS21         | NM_001024.2 | Ribosomales Protein       |

|    |          |             |                             |
|----|----------|-------------|-----------------------------|
| 1  | CUGBP2   | AF295066.1  | RNA bindend                 |
| 4  | ARHGDI1B | BC009200.2  | Signaltransduktion          |
| 1  | RAP2B    | AC117394.10 | Signaltransduktion          |
| 1  | AKAP9    | NM_147185.1 | Signaltransduktion          |
| 1  | PRKCBP1  | AL031666.6  | Signaltransduktion          |
| 1  | FTL      | BC058820.1  | Speicherprotein             |
| 3  | SNRPG    | NM_003096.2 | Splicing                    |
| 2  | HNRPD1   | BC007392.1  | Splicing                    |
| 1  | SNRPD2   | NM_177542.1 | Splicing                    |
| 1  | SFRS3    | BC000914.1  | Splicing                    |
| 2  | SLC5A3   | AF027153.1  | Transporter/Osmoregulation  |
| 1  | CCNL1    | BC025986.1  | Transkription               |
| 1  | KIAA1235 | AB033061.1  | Transkription               |
| 1  | TERT     | AF043739.1  | Transkription               |
| 1  | POLR2K   | BC000806.1  | Transkription               |
| 1  | PC4      | BC022339.1  | Transkription               |
| 3  | ZNF236   | AK000847.1  | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | ILF2     | NM_004515.2 | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | ZFP36L1  | NM_004926.2 | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | ZFP36L2  | NM_006887.3 | Transkriptionsfaktor        |
| 1  | ZNF8     | XM_034263.6 | Transkriptionsfaktor        |
| 2  | eEF1A-1  | BC057391.1  | Translation                 |
| 1  | VAPA     | NM_194434.1 | Transport/Vesikeltransport  |
| 5  | CAPZA1   | BC000144.1  | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 1  | VIM      | BC030573.2  | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 1  | STMN1    | J04991.1    | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 1  | MAPRE1   | NM_012325.1 | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 17 | GNLY     | NM_012483.1 | Zytotoxizität               |

Tab. 4.4.4: NK+IL-21 nach Subtraktion von NK+IL-2.

| Häufigkeit | Gensymbol | Acc.-Nr.    | Klassifizierung           |
|------------|-----------|-------------|---------------------------|
| 2          | HSPE1     | BC023518.2  | Chaperonin                |
| 1          | PPP1CB    | BC002697.2  | Enzym/Dephosphorylase     |
| 1          | HSLK      | NM_014720.2 | Enzym/Kinase              |
| 1          | PGK1      | CR625638.1  | Enzym/Kinase              |
| 6          | FLJ42222  | AK124216.1  | Hypothetisches Protein    |
| 6          | FLJ20343  | NM_017775.2 | Hypothetisches Protein    |
| 1          | NKG7      | NM_005601.3 | Integrales Membranprotein |
| 1          | ITM2A     | BC040437.1  | Membranprotein            |
| 1          | HLA-Bw62  | AK026595.1  | MHC                       |
| 2          | ZCCHC2    | NM_017742.3 | Nucleinsäurebindend       |
| 3          | KTN1      | BC050555.1  | Proteintransport          |
| 1          | RPS9      | NM_001013.2 | Ribosomales Protein       |
| 1          | RPL35     | NM_007209.2 | Ribosomales Protein       |
| 1          | SRGAP2    | BC036880.1  | Signaltransduktion        |
| 13         | HNRPD1    | BC007392.2  | Splicing                  |
| 1          | SRRM2     | BC041155.1  | Splicing                  |
| 3          | ARID5B    | BX648835.1  | Transkription             |
| 2          | EWSR1     | X73004.1    | Transkription/Repressor   |
| 1          | ZNF236    | AK000847.1  | Transkriptionsfaktor      |

|   |         |             |                             |
|---|---------|-------------|-----------------------------|
| 1 | SLC38A2 | BC016909.1  | Transporter                 |
| 1 | CDC10   | BC022442.1  | Zellzyklus                  |
| 1 | CAPZA1  | BC034391.1  | Zytoskelett/Strukturprotein |
| 1 | ACTB    | NM_001101.2 | Zytoskelett/Strukturprotein |

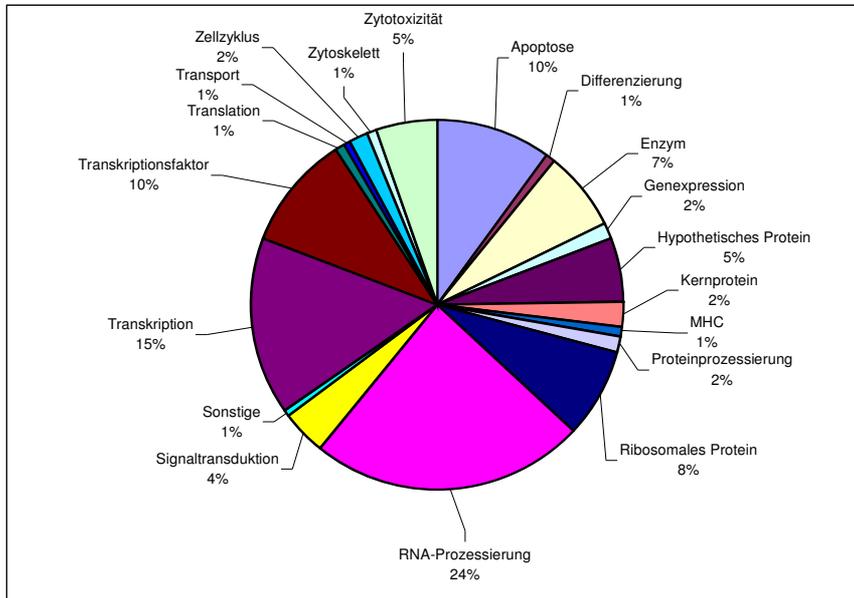


Abb. 4.4.6: Mit IL-2 kultivierte NK-Zellen nach Subtraktion von mit IL-15 kultivierten NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

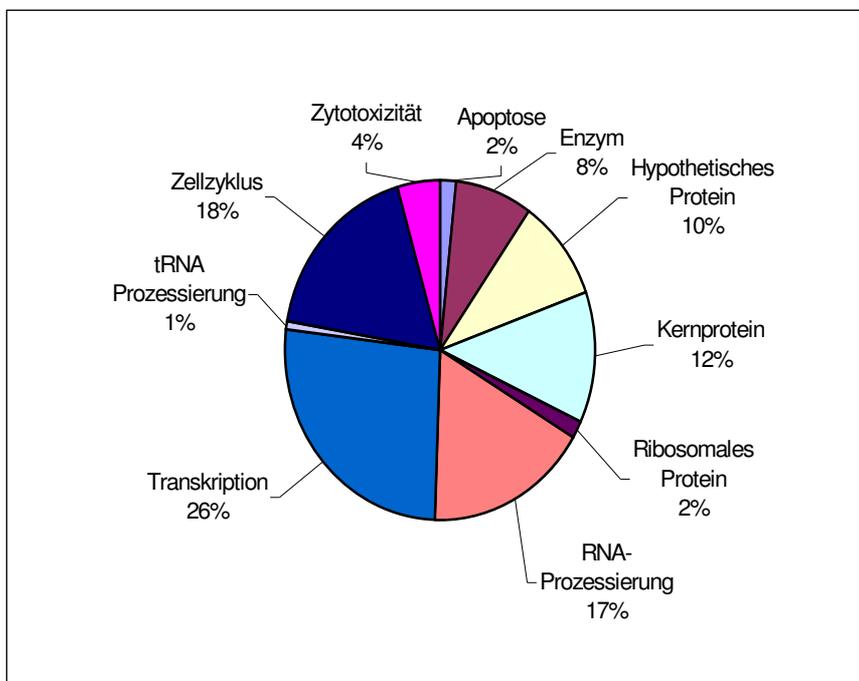


Abb. 4.4.7: Mit IL-2 kultivierte NK-Zellen nach Subtraktion von mit IL-21 kultivierten NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

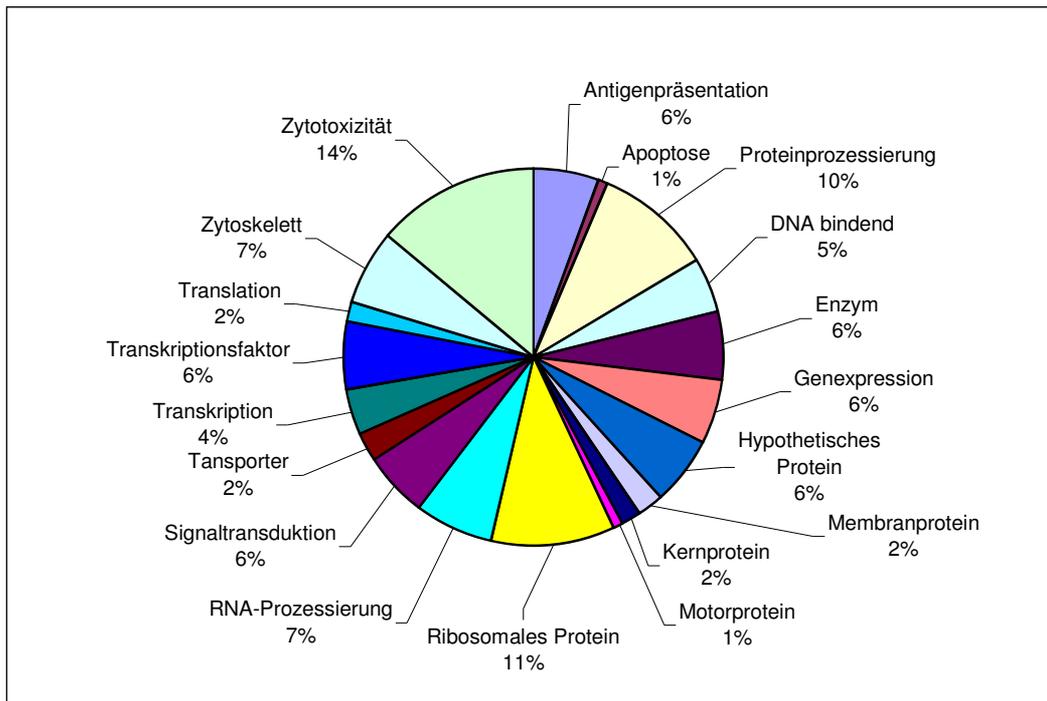


Abb. 4.4.8: Mit IL-15 kultivierte NK-Zellen nach Subtraktion von mit IL-2 kultivierten NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

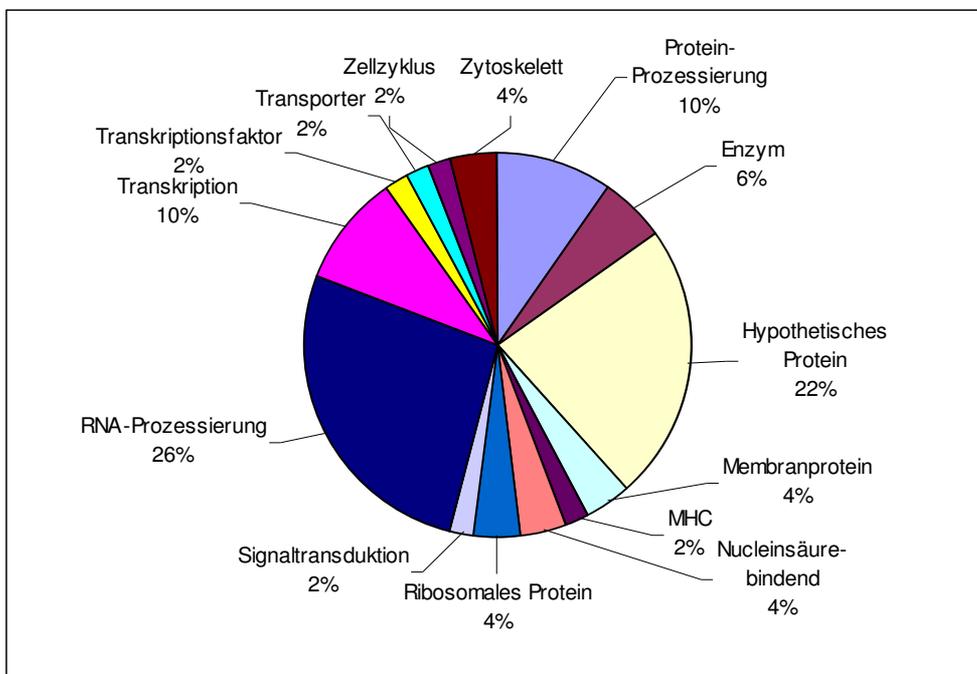


Abb. 4.4.9: Mit IL-21 kultivierte NK-Zellen nach Subtraktion von mit IL-2 kultivierten NK-Zellen, prozentuale Verteilung aller sequenzierten Klone.

#### 4.4.8 Expressionsanalyse mit Real-time PCR

Für eine weiterführende Untersuchung der Expression verschiedener Faktoren wurden Real-time PCR durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Faktoren aus den subtraktiven cDNA-Banken von NK-Zellen, die mit IL-15 oder IL-21 kultiviert wurden ausgewählt, als auch Faktoren, die in der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen versus CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurden.

Zunächst wurde die Expression von drei Genen untersucht, die in NK-Zellen differentiell exprimiert sind, die mit IL-21 kultiviert wurden. Dabei konnte die differentielle Expression bestätigt werden. Abbildung 4.4.10 zeigt, dass das "integral membrane protein II A" (*ITM2A*), ein Typ-II integrales Membranprotein, sowie "natural killer cell group 7 sequence" (*NKG7*), ein Typ-I integrales Membranprotein und das "Zink finger CCHC domain containing protein 2" (*ZCCHC2*), ein nucleinsäurebindendes Protein in den NK-Zellen, die mit IL-21 stimuliert wurden, stärker exprimiert sind als in den mit IL-15 stimulierten NK-Zellen oder den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen.

Abbildung 4.4.11 zeigt die Expression zweier Gene, die in den mit IL-15 und in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen gefunden wurden, bzw. die auch in den mit IL-2 kultivierten Zellen vorhanden waren. Das "heat shock 10kDa protein 1" (*HSPE1*), das als "chaperonin" eine Rolle bei der Proteinfaltung spielt, sowie das "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like" (*HNRPDL*), das an der mRNA-Generierung beteiligt ist, sind in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen stärker exprimiert als in den mit IL-15 oder IL-2 kultivierten NK-Zellen.

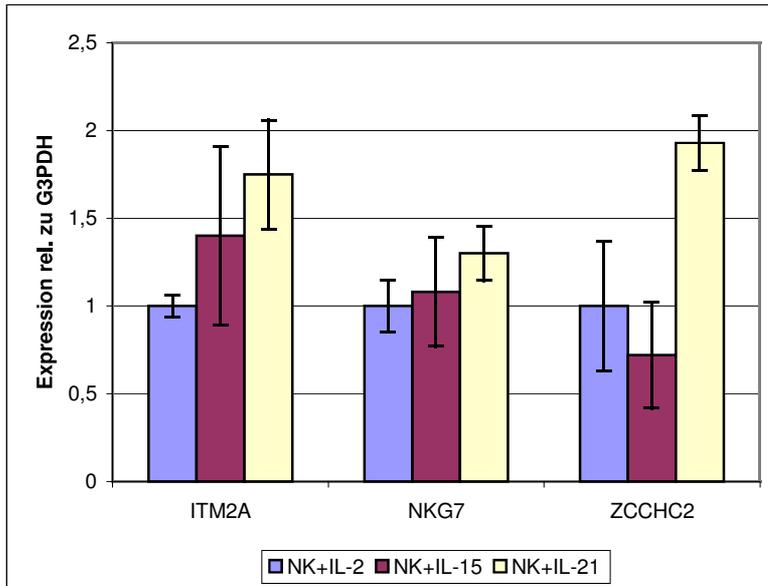


Abb. 4.4.10: Expression von *ITM2A*, *NKG7* und *ZCCHC2* in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

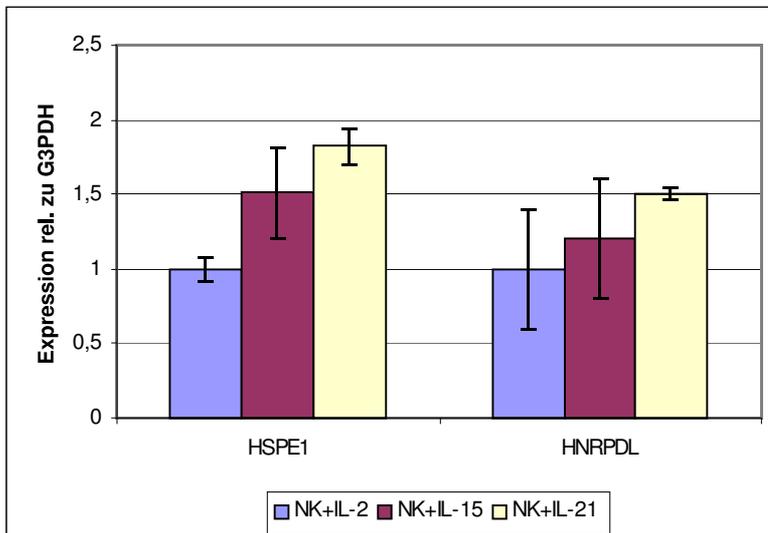


Abb. 4.4.11: Expression von *HSPE1* und *HNRPDL* in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

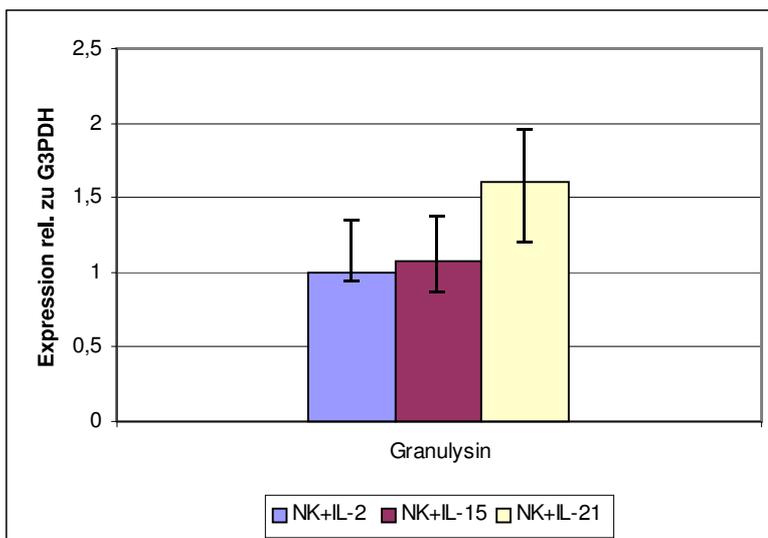


Abb. 4.4.12: Expression von Granulysin in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

Die Expression von Granulysin, einem wichtigen Effektormolekül der NK-Zellvermittelten Zytotoxizität, ist in Abbildung 4.4.12 dargestellt. Hier zeigte sich wieder eine stärkere Expression in den mit IL-21 behandelten NK-Zellen gegenüber den mit IL-15 oder IL-2 kultivierten Zellen. Granulysin wurde in fast allen cDNA-Banken aus NK-Zellen gefunden und ist besonders stark in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert.

IL-21 soll in NK-Zellen einen hemmenden Effekt auf die Proliferation ausüben, während IL-15 auf NK-Zellen aktivierend wirkt und die Proliferation steigert, deshalb wurde die Expression von zwei Faktoren untersucht, die am Zellzyklus beteiligt sind. Der "cyclin-dependent kinaseinhibitor 1" (*CDKN1A*) und "phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide" (*PIK3CG*) sind, wie Abbildung 4.4.13 zeigt, in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen am schwächsten exprimiert.

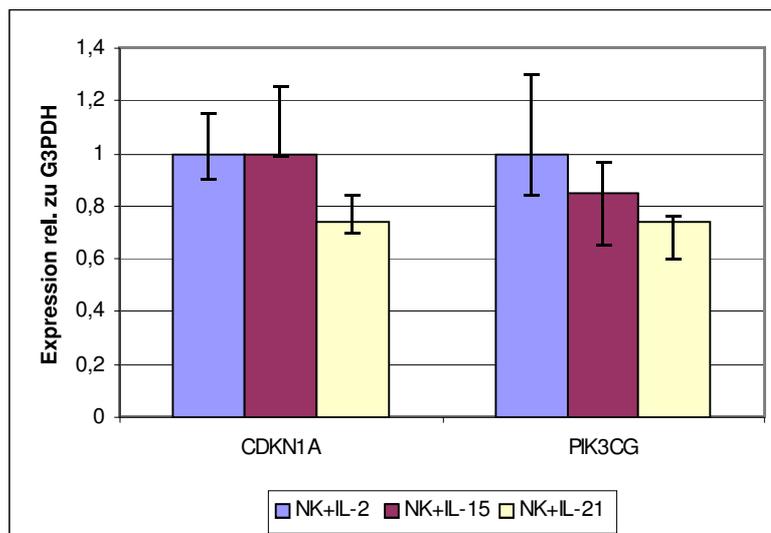


Abb. 4.4.13: Expression von *CDKN1A* und *PIK3CG* in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

Da in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Expression von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren besonders stark ist, wie durch die subtraktive cDNA-Bank aus NK-Zellen versus CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden konnte, wurde die Expression dieser Faktoren auch in den mit IL-15 bzw. IL-21 kultivierten NK-Zellen untersucht. Die Abbildung 4.4.14 zeigt, dass *RREB1*, *PLZF*, *ZNF211* und *ZNF236* in den mit IL-21

behandelten Zellen deutlich stärker exprimiert ist, als in den mit IL-15 oder IL-2 behandelten. In den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen sind alle Faktoren jeweils am schwächsten exprimiert, außer *PLZF*, das in den mit IL-15 kultivierten NK-Zellen weniger stark vorhanden ist, als in den mit IL-2 kultivierten. Zwischen den mit IL-15 und mit IL-2 kultivierten NK-Zellen ist bei *RREB1*, *PLZF* und *ZNF211* der Unterschied in der Expressionsstärke allerdings nicht sehr hoch.

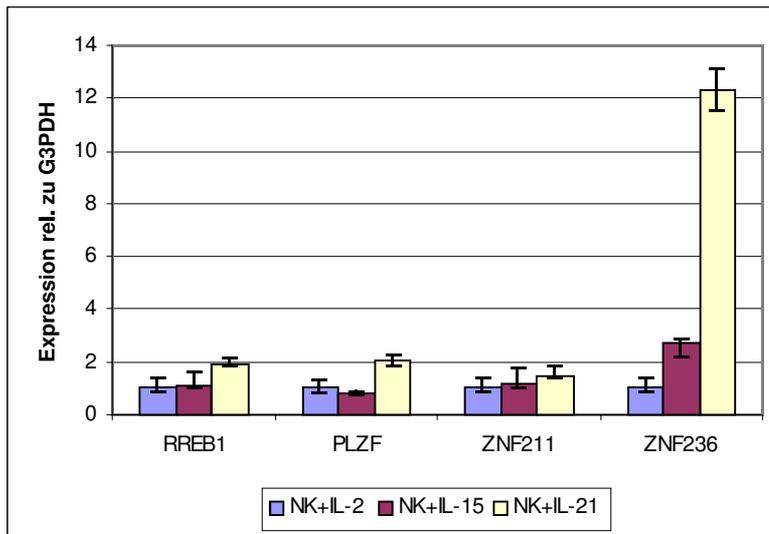


Abb. 4.4.14: Expression von *RREB1*, *PLZF*, *ZNF211* und *ZNF236* in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

Nachdem die in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen stärker vertretenen Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen besonders deutlich exprimiert waren, wurden weitere Faktoren getestet, die in der subtraktiven NK-Zell cDNA-Bank gefunden worden waren und die in frisch isolierten NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert sind. Hierbei handelt es sich um den "translation initiationfactor eIF-2B subunit epsilon" (*EIF2B5*) und den "eukaryotic translation initiationfactor 2, subunit 3 gamma" (*EIF2S3*), die beide an der Translation beteiligt sind und um das "nuclear receptor coactivator 6 interacting protein" (*NCOA6IP*) und das "transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1" (*TCEB1*, *Elongin C*), die beide eine Rolle bei der Transkription spielen (Abbildung 4.4.15). Bis auf *NCOA6IP* ist die Expression aller Faktoren in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen am höchsten. *NCOA6IP* ist in den mit IL-15 behandelten NK-Zellen sehr stark exprimiert, in den mit IL-21 behandelten Zellen dagegen schwächer als in den mit IL-2 kultivierten. Bei

*TCEB1* verhält es sich umgekehrt, hier ist die Expression in den mit IL-15 kultivierten Zellen am schwächsten.

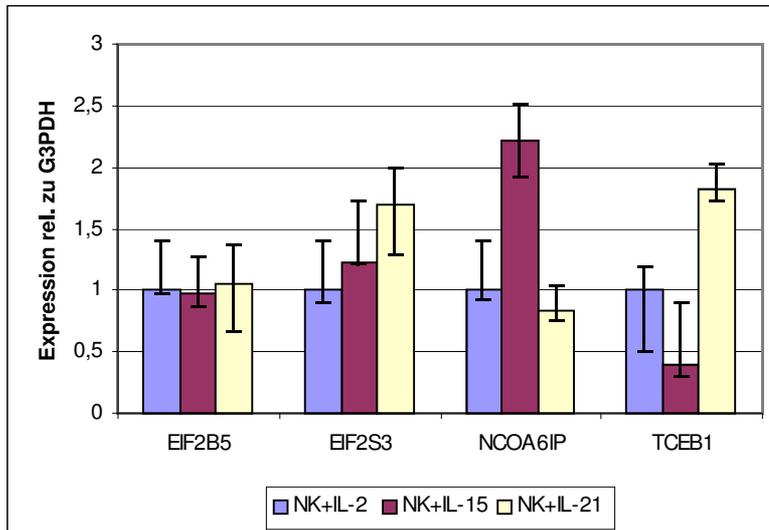


Abb. 4.4.15: Expression von *EIF2B5* und *EIF2S3* und von *NCOA6IP* und *TCEB1* in NK+IL-2 und in mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen.

## 4.5 PLZF

### 4.5.1 Expression von PLZF in NK-, CD8<sup>+</sup> T-, CD34<sup>+</sup>- und KG1-Zellen

Bei der Untersuchung der Expression der differentiell exprimierten Gene zeigte sich, dass besonders einige Zinkfinger Transkriptionsfaktoren (Abb. 4.2.22) in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen stärker exprimiert werden. Die Expression eines Zinkfingerproteines, *PLZF* (ZNF145, ZBTB16) wurde anschließend in IL-2-kultivierten sowie frisch isolierten NK-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen und der Zelllinie KG1 mittels PCR und Real-time PCR untersucht. Für CD34<sup>+</sup>-Zellen und KG1-Zellen ist die Expression von *PLZF* bekannt (Reid et al., 1995, Chen et al., 1993).

In den frisch isolierten NK-Zellen war die *PLZF*-Expression fast so hoch wie in den KG1-Zellen und 3-mal höher als in den CD34<sup>+</sup>-Zellen. Gegenüber den IL-2-kultivierten NK-Zellen (Abb. 4.5.1.1, kNK) konnte in den frisch isolierten NK-Zellen eine fast 6-fach stärkere Expression von *PLZF* gezeigt werden. In den NK-Zelllinien NKL, NK3.3 und NK92 konnte keine *PLZF*-Expression festgestellt werden (hier nicht gezeigt).

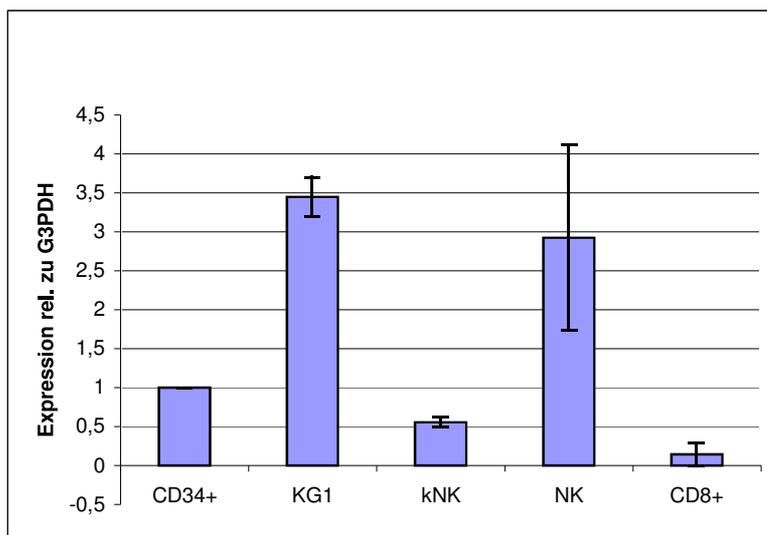
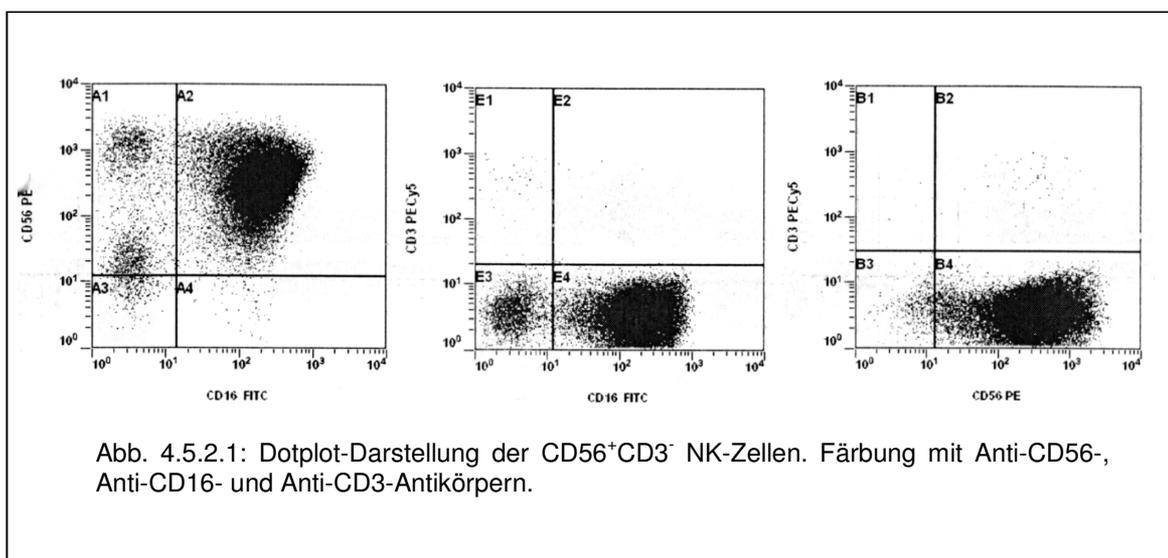


Abb. 4.5.1.1 Expression von *PLZF* in verschiedenen Zellen und Zelllinien. Bei kNK handelt es sich um kultivierte NK-Zellen aus peripherem Blut.

#### 4.5.2. Kultivierung von NK-Zellen aus peripherem Blut

Bei den Expressions-Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass *PLZF* in kultivierten NK-Zellen weniger stark exprimiert wird, als in frisch isolierten NK-Zellen aus peripherem Blut (siehe Abb. 4.5.1.1). Um die Regulation von *PLZF* genauer zu untersuchen, wurde eine mehrwöchige Kultivierung von aus peripherem Blut isolierten NK-Zellen durchgeführt. Außerdem sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung die Expression von *PLZF* vermindert wird. Es wurden  $CD56^+CD3^-$  Zellen aus PBMC isoliert und mit NK-Medium kultiviert. Die Reinheit der Zellpopulation wurde vor der Kultivierung durch eine Durchflusszytometrie-Analyse überprüft, wobei die Zellen mit Anti-CD56-, Anti-CD16- und Anti-CD3-Antikörpern markiert wurden. Für die  $CD56^+CD3^-$  NK-Zellen konnte so eine Reinheit von 98,5 % bestimmt werden (Abb. 4.5.2.1).



Um festzustellen, ab wann die *PLZF*-Expression in NK-Zellen während der Kultivierung reduziert wird, wurden frische NK-Zellen aus peripherem Blut isoliert. Aus einem Teil dieser Zellen wurde am Tag der Isolierung RNA präpariert und später für die cDNA-Synthese als „Tag 0“-Probe verwendet. Die übrigen Zellen wurden in NK-Zell-Medium in einer 96-well Platte kultiviert. Bis zum 7. Tag wurden täglich ca. 200.000 Zellen für eine RNA-Präparation entnommen, die restlichen Zellen wurden weiter kultiviert. Weitere Proben wurden an Tag 11, 14 und 17 entnommen. Für alle Proben wurde die Expression von *PLZF* mit Real-time PCR untersucht.

Hierbei zeigte sich (Abb. 4.5.2.2), dass die *PLZF*-Expression schon am ersten Tag der Kultivierung deutlich zurückgeht; an Tag 1 wurde nur noch  $\frac{1}{4}$  der an Tag 0 vorhandenen Transkriptmenge gemessen. Diese geringe Expression ging in der zweiten Woche der Kultivierung noch weiter auf  $\frac{1}{7}$  und in der dritten Woche auf  $\frac{1}{11}$  der an Tag 0 vorhandenen Expressionsstärke zurück. In der vierten Woche der Kultivierung stieg die *PLZF*-Expression dann wieder auf den Wert, der in der ersten Woche gemessen wurde, an. Nach diesem Zeitraum wurde nur noch in der sechsten Woche eine Probe entnommen (Tag 41), da eine Kultivierung von NK-Zellen in der hier angewandten Form nur über etwa 4 Wochen möglich ist, danach teilen sich die Zellen kaum noch und sterben ab.

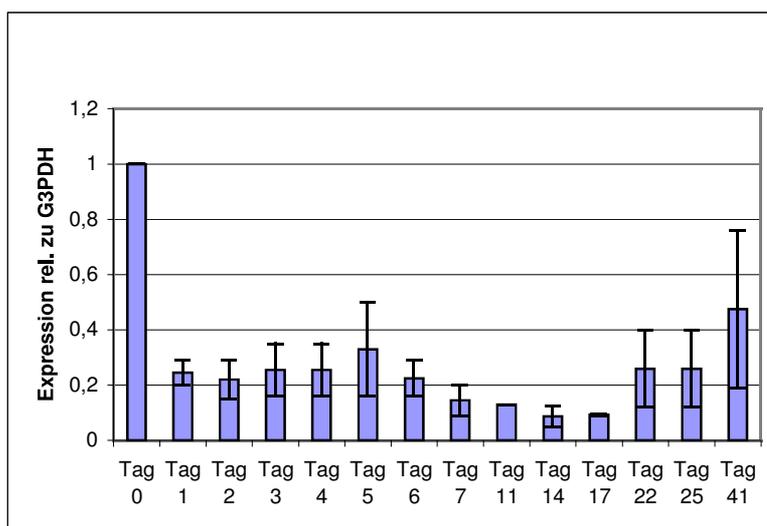


Abb. 4.5.2.2: Expression von *PLZF* in kultivierten NK-Zellen von Tag 0 bis Tag 41.

### 4.5.3 Expression von PLZF-regulierten Genen in NK-Zellen

Als Zielgene, die von PLZF reguliert, bzw. reprimiert werden, sind bisher *Cyclin A2* (*CCNA2*), *c-myc* und die  $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors (*IL-3R $\alpha$* , *CD123*) bekannt. *Cyclin A2* spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus (Pagano et al., 1992) und ist in proliferierenden Zellen vorhanden, während es bei Beginn der Mitose abgebaut wird. Seine Abwesenheit zeigt somit, dass die Zelle nicht mehr repliziert. Bei *c-myc* handelt es sich um ein Proto-Onkogen, das an der Proliferation, der Apoptose und der Differenzierung der Zelle beteiligt ist. Bei vielen Tumoren ist eine Aktivierung von *c-myc* zu beobachten (Dang, 1999). *IL3R $\alpha$*  ist der Rezeptor für Interleukin-3 (IL-3) und gehört zur Zytokinrezeptorfamilie. IL-3 bewirkt die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Hara, 1996). Zellen, in denen die *PLZF*-Expression relativ hoch ist, sollten eine geringere Expression dieser Zielgene (*Cyclin A2*, *c-myc* und *IL-3R $\alpha$* ) haben, als Zellen, die wenig *PLZF* exprimieren. Umgekehrt sollte die Transkriptmenge an *Cyclin A2*, *c-myc*, bzw. *IL-3R $\alpha$*  steigen, wenn die *PLZF*-Expression zurückgeht.

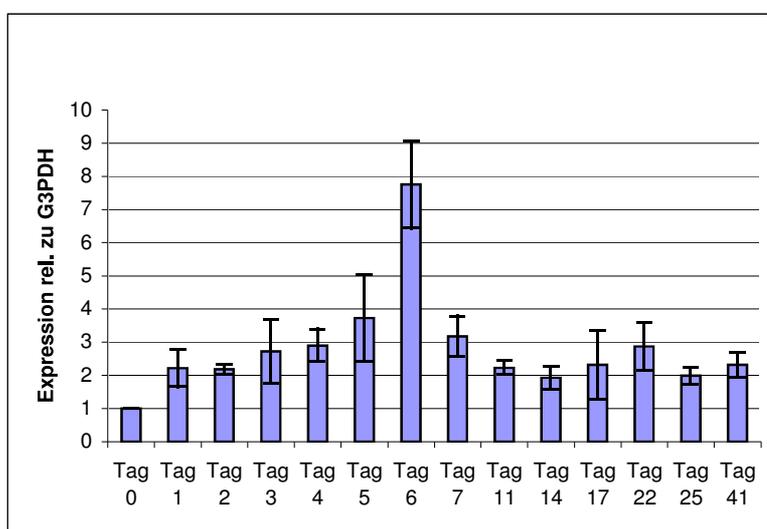


Abb. 4.5.3.1: Expression von *c-myc* in kultivierten NK-Zellen.

Abbildung 4.5.3.1 zeigt die Ergebnisse der Real-time PCR für die Expression von *c-myc* in kultivierten NK-Zellen. Hierbei ist ein Anstieg der Transkriptmenge von *c-myc* bis zum 6. Tag der Kultivierung zu beobachten, wobei an Tag 0, wenn die *PLZF*-Transkriptmenge am höchsten ist, die geringste Expression von *c-myc* zu

verzeichnen ist. Die Expression von *PLZF* dagegen nimmt nach dem ersten Tag der Kultivierung deutlich ab (Abbildung 4.5.2.2).

Für *Cyclin A2* konnte in der Real-time PCR gezeigt werden, dass es im Verlauf der Kultivierung der NK-Zellen verstärkt exprimiert wird (Abbildung 4.5.3.2), wobei die Transkriptmenge am letzten Tag, wenn die Expression von *PLZF* wieder ansteigt, deutlich zurückgeht.

Für *IL-3R $\alpha$*  konnte das nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich viel mehr das Gegenteil; mit sinkender *PLZF*-Transkriptmenge wurde auch weniger *IL-3R $\alpha$* -Transkript gemessen (hier nicht gezeigt).

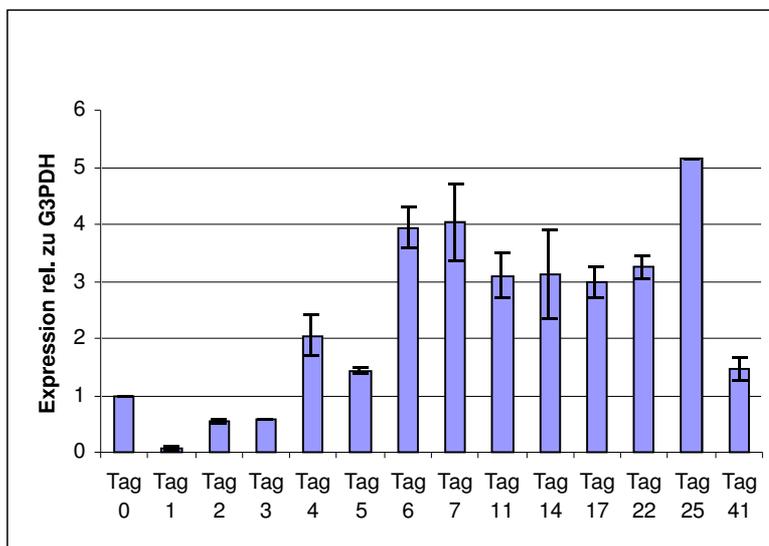


Abb. 4.5.3.2: Expression von *Cyclin A2* in kultivierten NK-Zellen aus peripherem Blut von Tag 0 bis Tag 22.

#### 4.5.4 Expression von Histondeacetylasen in kultivierten NK-Zellen

Die Transkriptionsregulation erfolgt auf epigenetischer Ebene durch eine Veränderung des Chromatinstatus. Zum einen kann eine Methylierung oder Demethylierung vorliegen, zum anderen können Histone acetyliert oder deacetyliert sein. In aktiven Chromatinabschnitten liegt eine hohe Acetylierung der Histone vor, während in inaktiven Chromatinabschnitten die Histone deacetyliert sind. Die Acetylierung und Deacetylierung wird von Histonacetyltransferasen und von Histondeacetylasen (HDAC) katalysiert. PLZF wirkt durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen an die betreffenden DNA-Abschnitte als Transkriptionsregulator

(David et al., 1998). Durch die Untersuchung der Expression verschiedener *HDAC* in kultivierten NK-Zellen sollte festgestellt werden, ob die Expression der *HDAC* mit der Expression von *PLZF*, das während der Kultivierung schwächer exprimiert wird, korreliert. Die Real-time PCR („Micro fluidic card“) mit 4 Proben der kultivierten NK-Zellen wurde von Frau Martina Sribar durchgeführt.

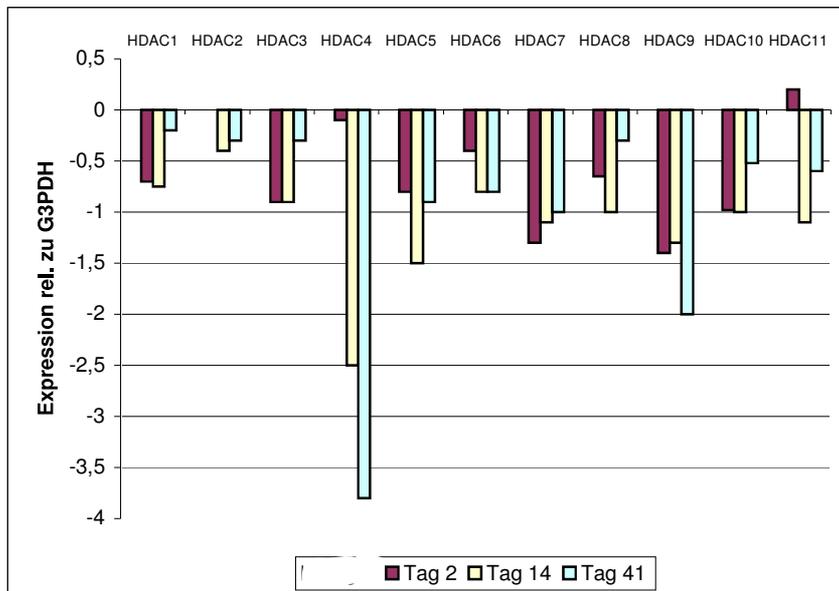


Abb. 4.5.4.1: Expression von *HDAC* in kultivierten NK-Zellen an Tag 2, 14 und 41, normiert auf Tag 0. Expression rel. zu *G3PDH*. Auf der y-Achse sind negative Werte dargestellt; die Expression ist zum größten Teil geringer als an Tag 0.

Die Abbildung 4.5.4.1 zeigt die Expression der *HDAC* relativ zu *G3PDH* im Vergleich zur Expression an Tag 0 (Tag 0 diente als Kalibrator und ist deshalb in der Abbildung nicht dargestellt). An Tag 2, an dem *PLZF* noch deutlich exprimiert wird, ist für einige *HDAC* die stärkste Expression zu verzeichnen, für *HDAC2*, 4 und besonders für *HDAC11*, während *HDAC7* und 9 relativ schwach exprimiert werden. An Tag 14, an dem die *PLZF*-Expression niedrig ist, sind alle *HDAC* schwach exprimiert, besonders *HDAC4*. Diese schwache Expression von *HDAC4* zeigt sich verstärkt an Tag 41, an dem die Expression von *PLZF* wieder ansteigt. Bis auf *HDAC4* und 9 steigt zu diesem Zeitpunkt die Expression der übrigen *HDAC* wieder an, besonders deutlich *HDAC1*, *HDAC3* und *HDAC8*. Für *HDAC1*, *HDAC3* und *HDAC4* konnte bisher eine Interaktion mit *PLZF* nachgewiesen werden (David et al., 1998; Li et al., 2000; Chauchereau et al., 2004). Für *HDAC1* und *HDAC3* bestätigt das hier gezeigte Ergebnis diesen Zusammenhang besonders deutlich, da der Unterschied in der Expressionsstärke der *HDAC* dem von *PLZF* entspricht. Für *HDAC4* kann ebenfalls

---

ein Zusammenhang mit der Expression von *PLZF* bestätigt werden, wobei hier die Expression am letzten Tag der Kultivierung, wenn die *PLZF*-Transkriptmenge wieder ansteigt, niedriger bleibt, als bei den übrigen *HDAC*.

#### 4.5.5 Expression von PLZF auf Proteinebene

Nachdem durch die Expressionsanalysen mittels Real-time PCR festgestellt worden war, dass *PLZF* in NK-Zellen stärker exprimiert wird als in CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sollte dieser Sachverhalt auf Proteinebene überprüft werden. Durch Lysieren der Zellen und anschließende Zentrifugation wurde ein Gesamtproteinextrakt gewonnen, dessen Konzentration durch eine photometrische Proteinbestimmung gemessen wurde. Auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Im Anschluss daran wurde ein Western Blot durchgeführt, um die Proteine auf eine Membran zu übertragen. Nach dem Blocken der nicht besetzten Stellen auf der Membran durch Magermilch wurde eine Inkubation mit einem anti-*PLZF*-Antikörper durchgeführt. Nach der Inkubation mit einem mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper wurde das Protein markiert und durch Verwendung von ECL mithilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Abb. 4.5.5.1 zeigt einen Western Blot mit Proteinproben aus KG1-, CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen sowie kultivierten (nach Isolierung aus peripherem Blut für 10 Tage kultiviert) und frisch isolierten NK-Zellen, die mit einem Antikörper gegen *PLZF* markiert wurden. KG-1-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet, da sie *PLZF* sehr stark exprimieren. Für *PLZF* ist in Polyacrylamidgelen eine Migration bei 80 - 90 kDa zu erwarten (Melnick und Licht 1999). Die deutlichen Banden für KG1- und frisch isolierte NK-Zellen in diesem Bereich zeigen eine Proteinexpression von *PLZF* in diesen Zellen. In CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte kein *PLZF*-Protein nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte kein *PLZF*-Protein in kultivierten NK-Zellen nachgewiesen werden, was nach der zuvor beobachteten schwachen Expression von *PLZF* in diesen Zellen zu erwarten war. Von Zhang et al. (1999) wurden mehrere Splicing-Varianten von *PLZF* beschrieben; da sowohl bei KG1- als auch bei NK-Zellen eine doppelte Bande für *PLZF* detektiert wurde, kann auf das Vorhandensein zweier Splicing-Varianten in diesen Zellen geschlossen werden. Dies wurde allerdings nicht genauer untersucht, da in erster Linie die generelle Expression von *PLZF* in den verschiedenen Zellpopulationen von Interesse war.

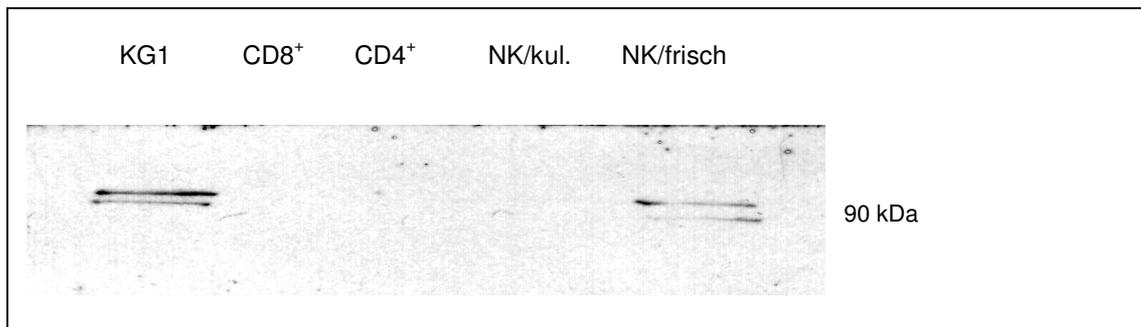


Abb. 4.5.5.1: Western Blot mit PLZF-Antikörper. Aufgetragen wurden Proteinpräparationen aus KG1-, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, kultivierten NK- und frisch isolierten NK- Zellen.

#### 4.6 ChIP – Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ermöglicht den Nachweis von Histonmodifikationen sowie der Bindung von Transkriptionsfaktoren in bestimmten Bereichen eines Gens. Da bei dieser Methode die an die DNA bindenden Proteine vor der Weiterverarbeitung der DNA fixiert werden, beschreiben die Ergebnisse den tatsächlichen Zustand der Histonmodifikation oder der Bindung anderer Proteine in der Zelle.

Die Abbildungen 4.6.1 und 4.6.2 zeigen die Transkriptmenge an *Cyclin A2* und *IL3R $\alpha$* -Promotor in NK-Zellen nach Präzipitation mit PLZF-Antikörper. Für beide Promotoren ist eine Bindung von PLZF bekannt, das als Repressor für *Cyclin A2* und *IL3R $\alpha$*  wirkt. Wie zu erwarten, konnte für beide Promotoren eine deutliche Bindung von PLZF nachgewiesen werden.

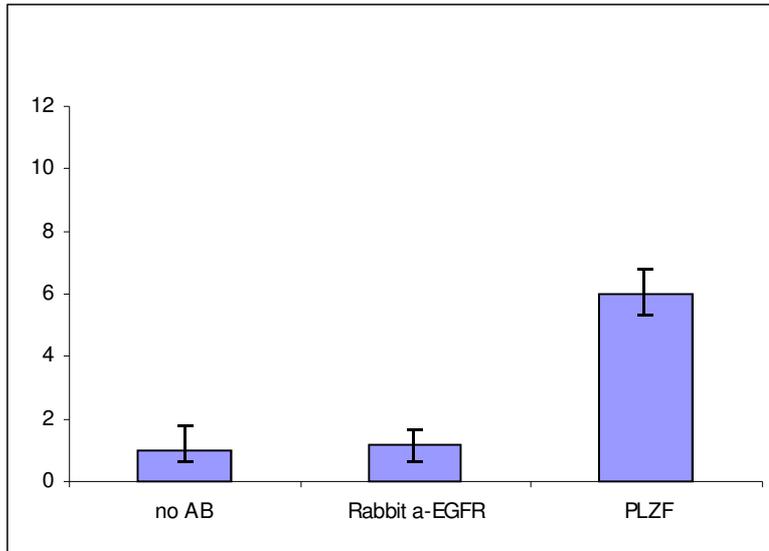


Abb. 4.6.1: Real-time PCR mit Primern für den *Cyclin A2*-Promotorbereich nach Chromatin-Immunopräzipitation mit PLZF-Antikörper in NK-Zellen.

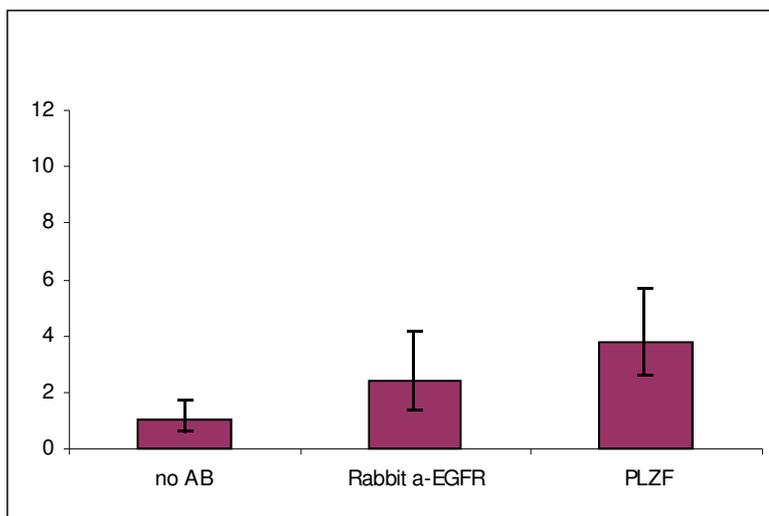


Abb. 4.6.2: Real-time PCR mit Primern für den *IL3Rα*-Promotorbereich nach Chromatin-Immunopräzipitation mit PLZF Antikörper in NK-Zellen.

Zur Untersuchung einer Beteiligung von PLZF an der Regulation von NK-Zell-Rezeptoren wurden Chromatin-Immunopräzipitationen mit PLZF-Antikörper durchgeführt. Für die KIR-Gene konnte bereits eine Transkriptionsregulation auf epigenetischer Ebene gezeigt werden (Santourlidis et al., 2002). Da PLZF ebenfalls auf diese Art die Transkription seiner Zielgene reguliert, indem es mit Histondeacetylasen zusammenwirkt, wurde untersucht, ob PLZF an die KIR-Promotoren bindet.

In einer Real-time PCR mit Primern für den *KIR2DL3*-Promotor wurden die Proben, die ohne Antikörper behandelt wurden und die Proben, die mit einem Antikörper

gegen acetylierte und methylierte Histonreste präzipitiert wurden, verglichen. In CD34<sup>+</sup>-Zellen konnte allerdings nur eine schwache Bindung von PLZF an den *2DL3*-Promotor nachgewiesen werden, die Transkriptmenge an *2DL3* ist in der mit PLZF präzipitierten Probe geringer als in der ohne Antikörper oder der mit dem Kontrollantikörper (Rabbit  $\alpha$ -EGFR) präzipitierten Probe. Die Histonmodifikation wurde durch Verwendung eines Antikörpers gegen dimethyliertes Histon (dimeH3K9) untersucht, während für die Untersuchung der Acetylierung ein Antikörper gegen acetyliertes Histon (AcH4K8) verwendet wurde. Abbildung 4.6.1 zeigt, dass die Methylierung von H3K9 im Promotorbereich hoch ist, während die Acetylierung von H4K8 hier gering ist, was beides auf einen "geschlossenen", bzw. nicht aktiven Chromatinbereich schließen lässt. Somit konnte zwar eine schwache Bindung von PLZF an den *2DL3*-Promotor nachgewiesen werden, die aber nicht auf eine Regulation des *2DL3*-Promotors durch PLZF hindeutet.

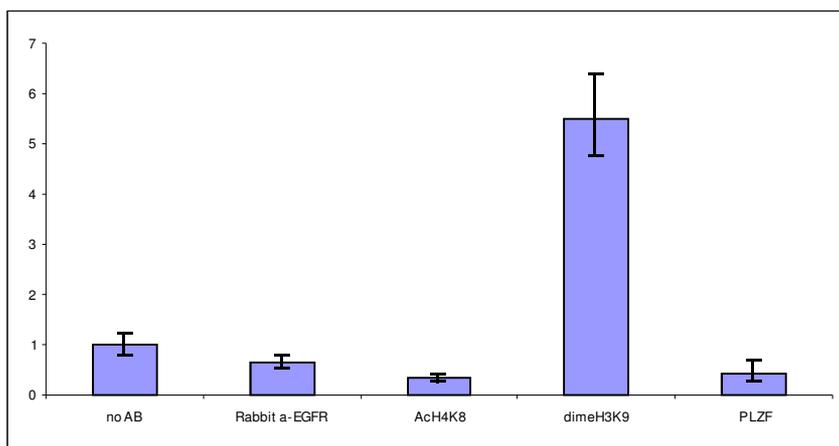


Abb. 4.6.3: Real-time PCR mit *2DL3*-Primer nach ChIP mit verschiedenen Antikörpern in CD34<sup>+</sup>-Zellen. no AB = ohne Antikörper, Rabbit  $\alpha$ -EGFR = Antikörper gegen EGFR aus Kaninchen, AcH4K8 = Antikörper gegen acetyliertes Histon, dimeH3K9 = Antikörper gegen dimethyliertes Histon, PLZF = Antikörper gegen PLZF.

#### 4.7 ChIP and clone – Klonierung der an PLZF bindenden DNA

Da die bisher bekannten Zielgene für PLZF nicht NK-Zell-spezifisch sind, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit NK-Zellen aus peripherem Blut und einem PLZF-Antikörper durchgeführt. Auf diese Weise sollten DNA-Abschnitte identifiziert werden, an die PLZF in NK-Zellen bindet. Diese Methode der Klonierung von ChIP-Produkten wurde bereits mehrfach beschrieben (Huang et al., 2006; LeBaron et al., 2005; Nelson et al., 2004; Weinmann et al., 2001). Die präzipitierten DNA-Fragmente

wurden in einen Vektor kloniert, der in *E.coli* transformiert wurde. Trotz blau-weiß-Selektion war die Klonierung der ChIP-Produkte relativ uneffizient. Aus den positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit BLAST analysiert. Als Ergebnis wurde 4-mal eine Sequenz mit der Genbank-Nummer AB012286 erhalten, die für die 5'-Region des humanen  $\beta_4$ -Integrin Gens steht. Diese von Takaoka et al. (1998) klonierte Region des  $\beta_4$ -Integrin (*ITGB4*) Gens besitzt einen hohen G/C-Gehalt und keine TATA-Box.

Ein Vergleich mit bekannten PLZF-Bindestellen ergab unterschiedliche Ergebnisse. Für die von Sitterlin et al. (1997) postulierten potentiellen Bindestellen konnte keine Übereinstimmung gefunden werden. Die Bindestellen, die von Li et al. (1997) beschrieben wurden, sind im Gegensatz dazu in der Sequenz von *ITGB4* zu finden. Als mögliche Konsensussequenz nennen Li et al. A(T/G)(G/C)T(A/C)(A/C)AGT. Eine Kombination dieser Sequenz ist mit ATGTACATTCTCAAGT in der *ITGB4* Sequenz zu finden. Abbildung 4.7.1 zeigt die Sequenz von *ITGB4* mit der möglichen Bindestelle für PLZF. Zusätzlich ist der potentielle Transkriptionsstartpunkt markiert, der von Takaoka et al. (1998) bestimmt wurde.

Bei einer Untersuchung der mit PLZF-Antikörper präzipitierten Proben mit Real-time PCR unter Verwendung von Primern für den *ITGB4*-Promotor wurde eine Bindung von PLZF bestätigt. Abbildung 4.7.2 zeigt die Transkriptmenge an *ITGB4*-Promotor nach der Präzipitation mit PLZF-Antikörper im Vergleich mit einer ohne Antikörper behandelten Probe jeweils relativ zur Transkriptmenge im unbehandelten Ausgangsmaterial („output“ bezogen auf „input“).

|      |   |                 |                 |                     |
|------|---|-----------------|-----------------|---------------------|
| 1861 | AACAGGTGCCAATCTACCAATAAGTA                                  | <u>ATGTACAT</u> | <u>TCTCAAGT</u> | AATAAGAATAGGGGCTCAG |
| 1921 | GGCTGGGCGCAATGACTCACGCCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGACAAGGCAGACGG |                 |                 |                     |

Abb. 4.7.1: Sequenz von *ITGB4* mit möglicher Bindestelle für PLZF: ATGTACAT TCTCAAGT .

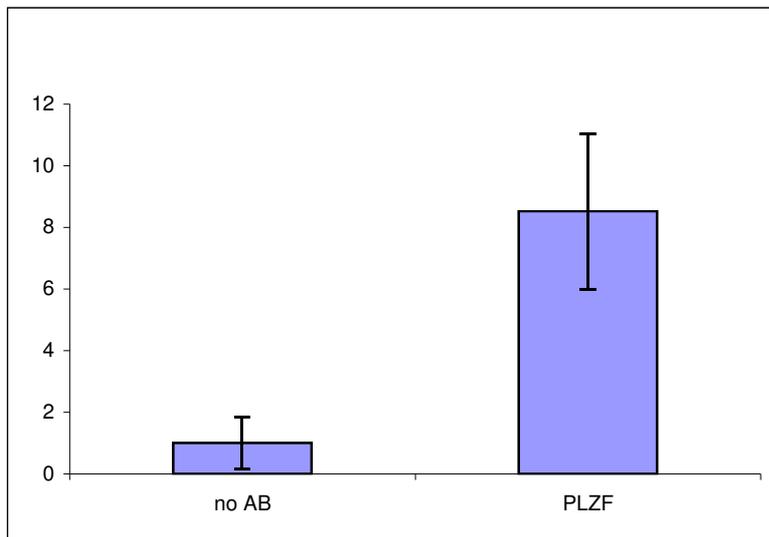


Abb. 4.7.2: Real-time PCR mit Primern für den *ITGB4*-Promotor nach Chromatin-Immunopräzipitation mit PLZF-Antikörper in NK-Zellen.

#### 4.8 Überexpression von PLZF in NK-Zellen und Zelllinien

Nachdem ein Zielgen für PLZF in NK-Zellen identifiziert worden war, sollte untersucht werden, in wie weit PLZF dieses Zielgen oder andere, bekannte Gene in ihrer Expression beeinflusst. Hierzu sollte eine Überexpression von PLZF durchgeführt werden. In den NK-Zelllinien NKL und NK3.3 wurde *PLZF* mithilfe eines Konstruktes, das von Frau Dr. Birgit Gellersen, Endokrinologikum Hamburg, zur Verfügung gestellt wurde, überexprimiert. Es handelt sich um den Vektor pcDNA3.1(+), in den die codierende Region des humanen *PLZF* kloniert wurde. Die Zellen wurden mit der Nucleofektionsmethode von Amaxa transfiziert und nach 3 Tagen durch die Zugabe von 700 µg Neomycin pro ml Medium selektiert. Nach zweiwöchiger Kultivierung in Selektionsmedium wurden je 20 Millionen Zellen entnommen und zur RNA-Isolierung eingesetzt. Mittels Real-time PCR wurde die Expression von *PLZF* und *ITGB4*

untersucht. Als Vergleich wurden jeweils nichttransfizierte Zellen von NK3.3 und NKL verwendet. Für die mit *PLZF* transfizierten NK3.3 Zellen zeigte die Real-time PCR einen starken Anstieg an *PLZF*-Transkript, etwa um das 180-fache (Abb. 4.8.1). Bei NKL dagegen konnte nach der Transfektion mit dem *PLZF*-Vektor keine Veränderung beobachtet werden. Bei diesen Zellen konnte in der nichttransfizierten Kontrolle kein *PLZF*-Transkript detektiert werden, während in nichttransfizierten NK3.3 Zellen eine sehr schwache Amplifikation zu beobachten war.

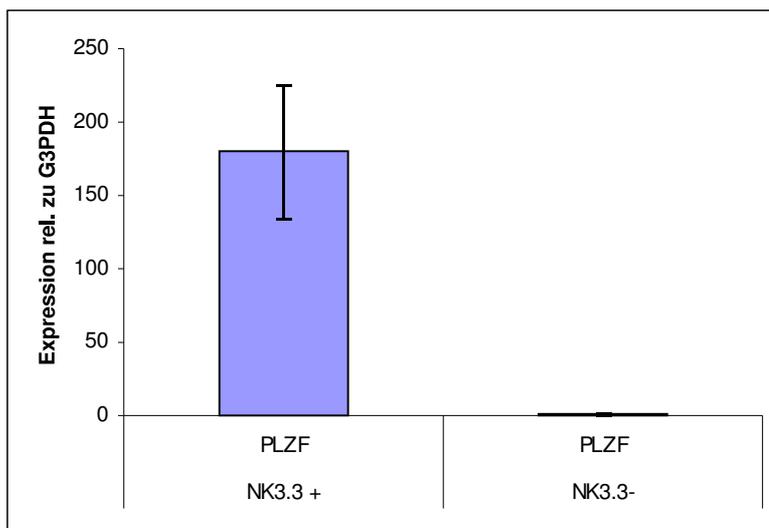


Abb. 4.8.1: Expression von *PLZF* in *PLZF*-transfizierten NK3.3 Zellen. NK3.3+ = mit *PLZF* transfizierte NK3.3-Zellen, NK3.3- = NK3.3-Zellen ohne *PLZF*. Expression relativ zu *G3PDH*.

Wie zu erwarten, zeigte sich für *ITGB4* im Vergleich der transfizierten und nichttransfizierten Proben kein Unterschied, es war bei beiden kein Amplifikat vorhanden. Da *PLZF* als Repressor seiner Zielgene wirkt, sollte durch seine Überexpression die Transkriptmenge an *ITGB4* zurückgehen, bzw. sich bei Zellen, die kein *ITGB4* exprimieren, nicht verändern.

Dasselbe Experiment wurde mit frischen NK-Zellen aus Nabelschnurblut durchgeführt. Es konnte allerdings keine weitere Auswertung vorgenommen werden, da die Zellen im Laufe der Kultivierung abstarben.

Somit konnte keine direkte Wirkung von *PLZF* auf *ITGB4* oder andere Gene gezeigt werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass *PLZF* durch seine Wirkung auf Gene wie *Cyclin A2* und *c-myc*, die ihrerseits Auswirkungen auf das Expressionsprofil der Zelle haben, einen pleiotropen Effekt besitzt.

#### 4.9 Regulation der Expression von PLZF

Durch Kultivierung mit 5-AZA-2'-Cytidin (Aza) sowie Trichostatin A (TSA) wurde in den NK-Zelllinien NKL und NK3.3 untersucht, ob die Expression von *PLZF* durch Methylierung bzw. Acetylierung reguliert wird. Aza bewirkt eine Inhibition der DNA-Methyltransferase DNMT-1, die während der Replikation Methylgruppen auf die Cytosinreste überträgt. Wird DNMT-1 inhibiert, kommt es zu einer Hypomethylierung, einem Verlust der Methylgruppen und dadurch zu einer verstärkten Transkription des Gens. Nach der Kultivierung der Zellen mit Aza wurde mittels PCR überprüft, ob sich der Methylierungszustand verändert hat. War vor der Verwendung von Aza die Expression des Gens schwächer, kann angenommen werden, dass es durch eine Hypermethylierung inaktiv war.

Der Deacetylaseinhibitor TSA verhindert, dass die Acetylgruppen an den Histonresten durch Histondeacetylasen (HDACs) entfernt werden. Wurde ein Gen vor der Kultivierung der Zellen mit TSA schwächer exprimiert, lässt das auf einen durch HDACs bewirkten „geschlossenen“ Chromatinstatus dieser DNA-Region schließen.

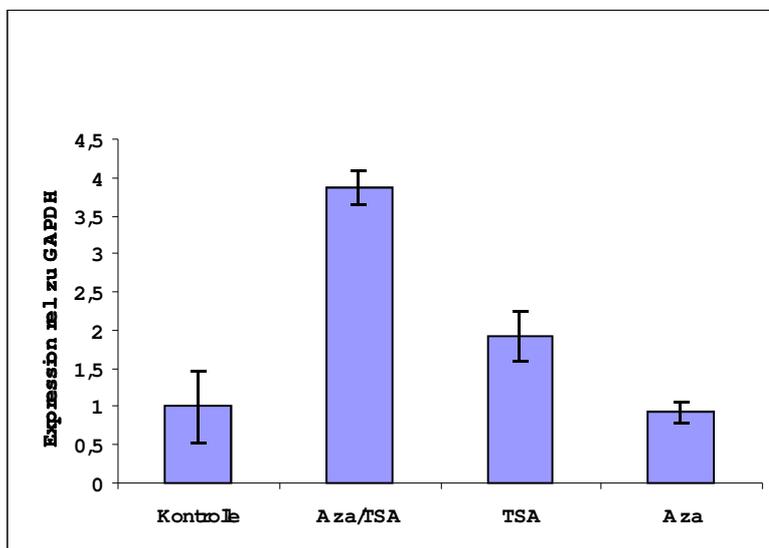


Abb. 4.9.1: Expression von *PLZF* in NKL nach Kultivierung mit Aza/TSA, TSA und Aza.

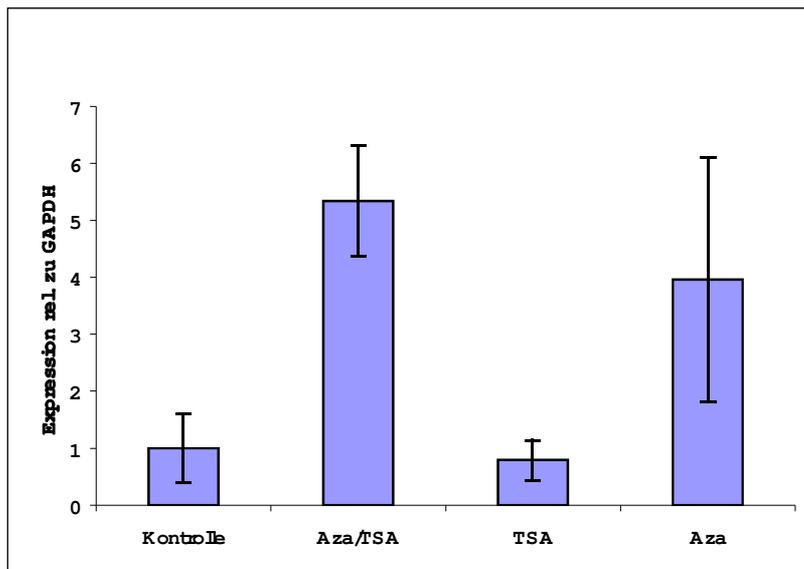


Abb. 4.9.2: Expression von *PLZF* in NK3.3 nach Kultivierung mit Aza/TSA, TSA und Aza.

Die Abbildungen 4.9.1 und 4.9.2 zeigen die Ergebnisse der Real-time PCR für die Expression von *PLZF* in mit Aza/TSA, TSA und Aza behandelten NKL- und NK3.3-Zellen. In beiden Zelllinien ist die *PLZF*-Expression nach Kultivierung mit Aza und TSA deutlich angestiegen. Eine Kultivierung mit TSA alleine bewirkt nur bei NKL einen Anstieg der *PLZF*-Expression, bei NK3.3 dagegen ist die *PLZF*-Expression in der so behandelten Probe geringer als in der unbehandelten Kontrolle. Umgekehrt verhält es sich mit den mit Aza kultivierten Zellen. Hier ist die *PLZF*-Expression in NK3.3 durch die Behandlung mit Aza deutlich angestiegen, während in NKL die *PLZF*-Expression in der mit Aza behandelten Probe niedriger als in der unbehandelten Kontrolle ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PLZF* durch die Kultivierung von NKL- bzw. NK3.3-Zellen mit Aza und TSA induzierbar ist. Allerdings kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht unterschieden werden, ob der Expressionsanstieg durch eine direkte Wirkung auf die DNA-Methylierung bzw. Histonacetylierung zustande kommt, oder ob es zu einem synergistischen Effekt kommt, bei dem andere Gene durch die Aza/TSA-Behandlung verstärkt exprimiert werden, die ihrerseits die Expression von *PLZF* beeinflussen.

---

## 5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die die Expression von Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen spezifisch regulieren. Zu diesem Zweck wurden cDNA-Bibliotheken von NK-Zellen erstellt und mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen verglichen, die eine NK-Zell-ähnliche Funktion besitzen aber keine NK-Zell-Rezeptoren exprimieren.

### 5.1 NK3.3- und Jurkat-Zellen

NK3.3- und Jurkat-Zellen sind Zelllinien, die häufig in NK- und T-Zell-relevanten Experimenten verwendet werden. Die Expression von NK- und T-Zelltypischen Genen in diesen beiden Zellpopulationen sollte durch die Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank untersucht werden.

Die Expressionsprofile beider Zelllinien spiegeln deutlich den jeweiligen Zelltypus wider. NK3.3-Zellen sind ein IL-2 abhängiger NK-Zellklon, der aus einer "mixed lymphocyte culture" (MLC) hervorgegangen ist (Kornbluth et al., 1982). Bei Jurkat handelt es sich um eine CD4-positive, T-Zellähnliche Zelllinie, die aus dem peripheren Blut einer an "acute lymphoblastic leukemia" (ALL) erkrankten Person stammt (Schneider et al., 1977). Die Isolierung der Zellen fand hierbei nach der Behandlung der Leukämie statt, was auf das hohe Wachstumspotential von Jurkat-Zellen schließen lässt. Übereinstimmend mit diesem unkontrollierten Wachstum finden sich im Expressionsprofil für Jurkat (Abb. 4.1.5) keine Sequenzen für Faktoren, die eine Rolle für die Apoptose oder bei der Kontrolle des Zellzyklus spielen. Dafür sind aber die Genklassen stärker vertreten, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind, wie Stoffwechsel, Enzym, ribosomale Proteine und RNA-Prozessierung. Ebenfalls ist für eine Krebszelle zu erwarten, dass keine MHC-Sequenzen gefunden wurden, da entartete Zellen häufig die Expression von MHC-Molekülen herunterregulieren, um so der Entdeckung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen.

Das Expressionsprofil für NK3.3 (Abb. 4.1.4) zeigt entsprechend viele Sequenzen, die in nicht entarteten Zellen vorhanden sind. Zum einen sind Faktoren für die Apoptose und die Kontrolle des Zellzyklus vorhanden, was auf ein geregeltes

Zellwachstum schließen lässt, zum anderen wurden sehr viele MHC-Sequenzen gefunden sowie viele Sequenzen für Membranproteine. Wie für eine NK-Zelllinie zu erwarten, sind in der Liste der differentiell exprimierten Gene (Tab. 4.1.1) für NK-Zellen typische Sequenzen wie für den Immunoglobulin-artigen Rezeptor KIR2DL3 oder KIR-103AST (2DL4 Vorläufer) und für den Lektin-artigen Rezeptor KLRB1 (NKR-P1) vorhanden. Bei den Membranproteinen finden sich NK-Zelltypische Gene wie CD2, CD39, CD74 und CD96 und die der Zytotoxizität zugeordneten Gene sind ebenfalls für NK-Zellen zu erwarten, wie Granzym-B (*GZMB*), Granulysin (*GNLY*) und CathepsinW (*CTSW*).

Die Untersuchung der Expression der ausgewählten Gene konnte deren differentielle Expression in NK3.3 bestätigen. Die Transkriptionsfaktoren *BHLHB2* (Class B basic helix-loop-helix protein 2), *ITF2* (Immunoglobulin transcription factor 2) und *PSCDBP* (Pleckstrin homology Sec7 and coiled-coil domains-binding protein) sind in NK3.3 20-, 40- und über 60-fach stärker exprimiert als in Jurkat (Abb. 4.1.7).

## 5.2 NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut

NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen. Hierbei weisen sie die gleichen Effektormechanismen zur Abtötung ihrer Zielzellen auf. Sie erkennen ihre Zielzellen allerdings mithilfe jeweils anderer Rezeptoren, was auf eine unterschiedlich regulierte Genexpression in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen schließen lässt. Durch den Vergleich der Expressionsprofile beider Zellpopulationen sollten Faktoren identifiziert werden, die in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich exprimiert werden.

In der Liste der in NK-Zellen differentiell exprimierten Gene (Tab. 4.2.1) finden sich viele NK-Zell typische Sequenzen, deren Vorhandensein in der subtraktiven cDNA-Bank erwartet werden konnte. Hierzu zählen vor allem die Rezeptoren KLRB1 (NKR-P1), BY55 und KIR3DL1. Das Auffinden solcher Sequenzen bestätigt die Effektivität der Subtraktion ebenso, wie die Übereinstimmung mit der jeweiligen HLA-Typisierung der beiden Zellquellen. In den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 4.2.2) wurden als typische Sequenzen CD5, CD6 und CD8A gefunden, die alle auf T-Zellen exprimiert sind, sowie die T-Zell-Rezeptor beta und gamma Kette. Der Vergleich der Ergebnisse der cDNA-Banken mit den bekanntermaßen in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten

Genen, sowie die zusätzliche HLA-Typisierung können somit als Kontrolle der gesamten Subtraktion angesehen werden.

Die als weitere Ergänzung und Kontrolle der subtraktiven cDNA-Banken durchgeführten Microarray-Experimente (Tab. 4.2.4) bestätigten in gleicher Weise wie die HLA-Typisierung (Abb. 4.2.14 – 4.2.17) die Ergebnisse der Subtraktion. Bei dieser Methode werden große Mengen an Daten generiert, die genauso wie die Ergebnisse der cDNA-Banken durch weiterführende Experimente und Methoden bestätigt werden müssen, weshalb nach der Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken und nach Durchführung der Microarray-Experimente Real-time-Analysen für verschiedene Gene eingesetzt wurden. Hierfür wurden Faktoren ausgewählt, die in NK- bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen als differentiell exprimiert gefunden worden waren.

In der Genexpressionsanalyse von Obata-Onai et al. (2002) wurden die als differentiell exprimiert gefundenen Sequenzen aus NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls mittels PCR verifiziert, wobei das Auswahlkriterium auch hier das Vorhandensein in der einen und das Fehlen in der anderen Zellpopulation war. Im Vergleich mit dem Expressionsprofil für NK-Zellen von Obata-Onai et al. konnte in der vorliegenden Arbeit für mehrere Faktoren erstmals eine differentielle Expression in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren RREB1, PLZF, ZNF211 und ZNF236, sowie die Translationsfaktoren EIF2B5 und EIF2S3 und einige andere an der Transkription beteiligte Faktoren (BBX, NCOA6IP, SMARCF1 und TCEB1). Andererseits zeigten sich wie erwartet deutliche Übereinstimmungen, wie die Expression von *Granulysin*, *TNFRSF1B*, *Granzym B*, *FCGR3A (CD16)*, *ITGB2* und *KLRB1* in NK-Zellen oder die Expression verschiedener ribosomaler Sequenzen oder von *EEF2* in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren RREB1, PLZF, ZNF211 und ZNF236 gehören alle zur C2H2-Typ-Zinkfinger-Familie, die die größte Transkriptionsfaktorfamilie im menschlichen Proteom darstellt. Für *RREB1*, *ZNF211* und *ZNF236* wurde jeweils eine etwa doppelt so hohe Expression in NK-Zellen wie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet, während die Expression von *PLZF* etwa um das 29-fache höher war (Abb. 4.2.22). Für *RREB1* wurde von Thiagalingam et al. (1996) eine Bindung an ein Ras-responsive element (RRE) im Calcitonin-Promotor beschrieben, während Zhang et al. (1999) vermuten, dass *RREB1* an verschiedene Sequenzen bindet und somit unterschiedliche Gene reguliert. Von *ZNF211* ist bekannt, dass es im menschlichen Gehirn exprimiert wird (Becker et al., 1995), während *ZNF236* in unterschiedlichem

humanen Gewebe, vor allem in Skelettmuskel und ebenfalls im Gehirn gefunden wurde (Holmes et al., 1999). Für ZNF236 wurde von Holmes et al. (1999) festgestellt, dass es in Antwort auf erhöhte Glukosekonzentrationen in humanen Mesangialzellen verstärkt transkribiert wird.

Die Untersuchung der beiden Translationsfaktoren EIF2B5 (Eukaryotic translation initiation factor, bestehend aus 5 Untereinheiten  $\alpha - \epsilon$ , Pain, 1996; Hinnebusch, 2000) und EIF2S3 ergab eine verstärkte Expression in NK-Zellen, wobei die Expression von EIF2B5 nur leicht gegenüber der in CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht war (Abb. 4.2.20). Dies ist übereinstimmend mit der Beobachtung von Welsh et al. (1996), die für EIF2B5 eine Erhöhung der Transkriptmenge in T-Zellen erst nach einer Aktivierung feststellen konnten.

Andere an der Transkription beteiligte Faktoren aus der subtraktiven cDNA-Bank für NK-Zellen sind BBX, NCOA6IP, SMARCF1 und TCEB1 (ElonginC). Für alle vier Gene konnte durch die Real-time PCR die differentielle Expression in NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigt werden (Abb. 4.2.19). Interessant ist hierbei besonders SMARCF1 (ARID1A, OSA1, BAF250, BAF250A oder SWI-SNF complex protein 270), das eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes darstellt, der durch Veränderung der Nukleosomenstruktur eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA ermöglicht. Solche Veränderungen werden nach Workman und Kingston (1998) von drei verschiedenen Typen von Multiproteinkomplexen durchgeführt und beinhalten die Acetylierung oder Deacetylierung von Nukleosomen oder eine ATP-abhängige Veränderung der Nukleosomenstruktur, wobei diesen gesamten Modifikationen eine große Bedeutung für die Regulation eukaryotischer Gene beigemessen wird. Inoue et al. (2002) beschreiben SMARCF1 (OSA1) als die größte Untereinheit eines solchen Multiproteinkomplexes, des SWI/SNF-Komplexes und konnten zeigen, dass es die Aktivierung der Transkription durch Steroidhormonrezeptoren fördert. Die Bedeutung von SMARCF1 für die epigenetische Regulation der KIR-Rezeptoren wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe untersucht.

Für NCOA6IP (PRIP-interacting protein with methyltransferase domain, PIMT) fanden Zhu et al. (2001) eine mögliche Funktion als RNA-Methyltransferase, da es an S-Adenosyl-L-Methionin, den Methyl donor für Methyltransfer-Reaktionen und gleichzeitig an RNA bindet. NCOA6IP interagiert mit NCOA6 (Peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein, PRIP), einem Koaktivator, der an

nukleäre Rezeptoren bindet und hormonabhängig die Transkriptionsaktivität fördert. Diese Koaktivierung erfolgt für verschiedene Rezeptoren, für Steroide (Glukokortikoid-Rezeptor, GR und Estrogen-Rezeptor, ER), Retinoide (Retinsäure-Rezeptor, RAR und Retinoid X Rezeptor RXR), Thyroid-Hormone (TR), Vitamin-D3 (VDR) und Prostanoiden (Peroxisomenproliferator Aktivierter Rezeptor, PPAR).

BBX (HBP2) gehört zur Sox-Familie (Sry-related HMG box) von Transkriptionsfaktoren und soll nach Sanchez-Diaz et al. (2001) die Transkription während des Übergangs der G1- in die S-Phase des Zellzyklus aktivieren.

TCEB1 (ElonginC, oder RNA polymerase II transcription factor SIII subunit C) bildet zusammen mit der Untereinheit B den ElonginBC-Komplex, der an eine weitere Untereinheit A des Faktors SIII bindet und so dessen Aktivität als Transkriptions-Elongationsfaktor verstärkt (Aso et al., 1995; Duan et al., 1995). Außerdem wurde es von Hochstrasser (1996; 1998) als Komponente des von-Hippel Lindau Tumor-Suppressor-Komplexes beschrieben, der Proteine ubiquitiniert, damit sie anschließend von den Proteasomen abgebaut werden können. Hyman et al. (2002) fanden daraufhin, dass ElonginC in der Hefe die von ihm gebundenen Proteine vor einer Degradation schützt.

In CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich eine verstärkte Expression von *EEF-1* und *EEF-2* (Abb. 4.2.21), die nach Proud (1994) die Hauptfaktoren bei der Elongationsphase der Translation in höheren Eukaryoten sind. Hierbei vermittelt EEF-1, ein Multimer, die Bindung der aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, während EEF-2, ein Monomer, die Bewegung der Ribosomen entlang der mRNA bewirkt. Die Expression von *EEF-2* war in CD8<sup>+</sup> T-Zellen etwa 14 mal stärker als in NK-Zellen, während die *EEF-1*-Faktoren um etwa das 3- bis 5-fache stärker exprimiert wurden.

### 5.3 Mit IL-2, IL-15 und IL-21 kultivierte und frisch isolierte NK-Zellen

Neben IL-2, das die Zytotoxizität und die Proliferation fördert (Bonnema et al., 1994, Warren et al., 1993), sind vor allem IL-15 und IL-21 bei der Kultivierung von NK-Zellen von Bedeutung. IL-15 spielt eine große Rolle für das Überleben, die Proliferation und die Aktivierung von NK-Zellen (Budagian et al., 2006), während IL-21 die Proliferation reifer NK-Zellen einschränkt (Kasaian et al., 2002, Toomey et al., 2003), dabei aber die NK-Effektorfunktionen wie die Zytokinproduktion und die

Zytotoxizität fördert (Brady et al., 2004 und Strengell et al., 2003). Nach De Rham et al. (2007) soll sich durch IL-2, IL-15 und IL-21 sogar das Rezeptor-Repertoire von NK-Zellen modifizieren lassen.

Diese Auswirkungen der verschiedenen Zytokine auf das Expressionsprofil von NK-Zellen wurden mithilfe von weiteren subtraktiven cDNA-Banken untersucht. Hierbei wurden einerseits differentiell exprimierte Sequenzen für mit IL-2 kultivierte NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert und andererseits differentiell exprimierte Sequenzen für mit IL-2 kultivierte NK-Zellen gegenüber mit IL-15 (bzw. IL-21) kultivierte NK-Zellen (und umgekehrt).

Beim Vergleich der Ergebnisse zeigt sich, dass nur zwei der in den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen gefundenen Sequenzen (differentiell exprimiert gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Tab. 4.3.1) auch in frisch aus peripherem Blut isolierten NK-Zellen gefunden wurden. Hierbei handelt es sich um die Sequenz für den Rezeptor KLRB1 (CD161), sowie um die Sequenz für Granulysin. Beide Sequenzen wurden in frisch isolierten NK-Zellen relativ häufig gefunden (KLRB1 8x, Granulysin 240x).

Von den übrigen Sequenzen aus mit IL-2 kultivierten NK-Zellen wurden vier in den mit IL-15 kultivierten NK-Zellen (nach Subtraktion der mit IL-2 kultivierten NK-Zellen, Tab. 4.4.3) gefunden. Hierbei handelt es sich um die Sequenzen für FTL, ein Enzym, das am Eisenstoffwechsel beteiligt ist, für B2M, ein Protein, das an der Antigenpräsentation beteiligt ist, für IMAGE:4041403, ein Enzym, für C12orf2, ein hypothetisches Protein und für PRO1073 (auch CCNL1). Granulysin wurde ebenfalls in mit IL-15 kultivierten NK-Zellen gefunden, darüber hinaus auch in den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen nach Subtraktion der mit IL-15 oder IL-21 kultivierten NK-Zellen (Tab. 4.4.1 bzw. 4.4.2).

Diese gemeinsamen Sequenzen, die gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in mit IL-2 kultivierten NK-Zellen als auch in mit IL-15 kultivierten NK-Zellen vorhanden sind, scheinen in ihrer Expression durch die Stimulation der NK-Zellen durch die beiden Zytokine beeinflusst zu werden, da sie in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen (Tab. 4.4.4) nicht vorhanden sind.

Bei der Einordnung der gesamten Sequenzen in die verschiedenen Klassen von Genen zeigt sich, dass der prozentuale Anteil an Sequenzen für Rezeptoren in den kultivierten NK-Zellen dem in frisch isolierten NK-Zellen entspricht (ca. 3 %, Abb. 4.2.12 und Abb. 4.3.7). Alle übrigen Genklassen sind dagegen nicht im gleichen Verhältnis vertreten, oder sind gar nicht vorhanden. Sequenzen für Enzyme,

hypothetische Proteine, für Proteinprozessierung und ribosomale Proteine, sowie für Signaltransduktion, Transkriptionsfaktoren und Zytotoxizität sind in beiden NK-Zell-Banken vorhanden, aber in sehr unterschiedlichen Anteilen. Deutlich stärker vertreten sind in den kultivierten NK-Zellen die Sequenzen für Enzyme, hypothetische Proteine, Proteinprozessierung, ribosomale Proteine und Signaltransduktion. Dagegen sind die Sequenzen für Transkriptionsfaktoren weniger als in den frisch isolierten NK-Zellen und besonders die Sequenzen für Zytotoxizität sind deutlich weniger. Während zwei Genklassen nur in den kultivierten NK-Zellen vorhanden sind, nämlich Stoffwechsel und Antigenpräsentation, sind die Klassen Apoptose, DNA-bindend, Membranprotein, MHC, RNA-Prozessierung, Transkription, Translation, Zellzyklus und Zytoskelett gar nicht vertreten. Da die meisten dieser Genklassen auch in frisch isolierten NK-Zellen nur schwach vertreten sind, sind diese Unterschiede oder das Fehlen in den kultivierten NK-Zellen vermutlich darauf zurückzuführen, dass hier deutlich wenige Klone sequenziert wurden, als für die cDNA-Bank aus frisch isolierten NK-Zellen.

Die Expressionsprofile der mit IL-2, IL-15 und IL-21 kultivierten NK-Zellen (Tab. 4.4.1 – 4.4.4, Abb. 4.4.6 – 4.4.9) zeigen für alle Zellpopulationen, außer den mit IL-15 kultivierten Zellen, einen hohen Anteil an Faktoren für die RNA-Prozessierung und Transkription auf. Für die mit IL-15 kultivierten NK-Zellen wurde ein hoher Anteil an Faktoren der Zytotoxizität, der Proteinprozessierung und ribosomale Proteine gefunden. Das Vorhandensein der Transkriptionsfaktoren und Faktoren für die RNA-Prozessierung stimmt mit der proliferationsfördernden Wirkung von IL-2 überein, ebenso bestätigen die Faktoren der Zytotoxizität die Aktivierung durch IL-15. Allerdings spiegeln die Expressionsprofile die unterschiedlichen Auswirkungen der Kultivierung mit IL-2, IL-15 und IL-21 nicht so deutlich wider, wie die Unterschiede, die für NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden konnten, was auch dadurch begründet ist, dass wesentlich weniger Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken sequenziert werden konnten. Bei der Untersuchung der Expression verschiedener Gene mit Real-time PCR wurde eine erhöhte Expression von zwei Membranproteinen (*ITM2A* und *NKG7*, Abb. 4.4.10) in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen beobachtet. Ebenso war die Expression des Chaperonins *HSPE1* und des an der mRNA-Generierung beteiligten Faktors *HNRPDL* in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen stärker. Bei allen vier Faktoren war die Expression in den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen am geringsten. Etwa umgekehrt verhielt es sich mit *CDKN1A* und

*PIK3CG*, die beide am Zellzyklus beteiligt sind (Abb. 4.4.13). Hier war die Expression in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen schwächer als in den mit IL-2 oder IL-15 kultivierten Zellen, was die Beobachtung von Kasaian et al. und Toomey et al. bestätigt, dass IL-21 sich auf die Proliferation reifer NK-Zellen hemmend auswirkt.

Ein deutlicher Expressionsunterschied konnte für ein nukleinsäurebindendes Zinkfingerprotein gezeigt werden, das als differentiell in mit IL-21 stimulierten NK-Zellen gefunden wurde. Hier war die Transkriptmenge an *ZCCHC2* etwa doppelt so hoch wie bei den mit IL-2 und mit IL-15 kultivierten NK-Zellen. Die Untersuchung der Expression der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die in NK-Zellen differentiell exprimiert sind, zeigte eine etwas höhere Transkriptmenge für *RREB1*, *PLZF* und *ZNF211* in den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen, während die Expression für *ZNF236* bedeutend höher als bei den mit IL-2 und IL-15 kultivierten Zellen war.

Für Granulysin konnte bei den mit IL-21 kultivierten NK-Zellen eine 1,5-fach stärkere Expression gegenüber den mit IL-15 und den mit IL-2 kultivierten NK-Zellen gemessen werden (Abb. 4.4.12). was die Erhöhung der lytischen Aktivität (Roda et al., 2006) bzw. Zytotoxizität (Brady et al., 2004 und Strengell et al., 2003) in NK-Zellen durch die Stimulation durch IL-21 bestätigt.

Aus der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen versus  $CD8^+$  T-Zellen wurden die beiden an der Translation beteiligten Faktoren *EIF2B5* und *EIF2S3* untersucht, wobei sich für ersteren kaum Unterschiede in der Transkription in den drei unterschiedlich kultivierten NK-Zellpopulationen zeigten. Für *EIF2S3* wurde eine verstärkte Expression in den mit IL-21 kultivierten Zellen gemessen. Ebenso wurde für den Faktor *TCEB1*, der auch in der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen versus  $CD8^+$  T-Zellen gefunden worden war, eine hohe Expression in den IL-21-Zellen bestimmt, die mehr als doppelt so hoch war, wie in den mit IL-15 kultivierten NK-Zellen. Ein weiterer Faktor aus der subtraktiven cDNA-Bank aus NK-Zellen versus  $CD8^+$  T-Zellen, *NCOA6IP* war dagegen in den mit IL-15 stimulierten Zellen mehr als doppelt so stark exprimiert, wie in den NK-Zellen, die mit IL-21 kultiviert wurden. Beide Faktoren sind an der Transkription beteiligt.

#### 5.4 Expression von *PLZF* in verschiedenen Zellen und Zelllinien

Bei der Untersuchung der Expressionsprofile kultivierter NK-Zellen zeigte sich eine fast 6-fach stärkere Expression eines Zinkfinger-Transkriptionsfaktors in frisch aus peripherem Blut isolierten gegenüber kultivierten NK-Zellen. Hierbei handelt es sich um das promyelocytic leukemia zinc finger protein (*PLZF*). Das *PLZF*-Gen wurde zuerst bei einem Patienten mit akuter promyeloischer Leukämie (APL) entdeckt. Chen et al. (1993) stellten eine Translokation fest, durch die es zu einem Rearrangement zwischen dem Retinolsäure-Rezeptor alpha (*RAR $\alpha$* )-Gen und *PLZF* gekommen war. Das dadurch entstandene Fusionsprotein *PLZF-RAR $\alpha$*  bindet sowohl durch *RAR $\alpha$*  als auch durch *PLZF* an die DNA, was bewirkt, dass diese Form der Leukämie resistent gegen die Behandlung mit All-trans-Retinolsäure (ATRA) ist (Di Croce, 2005, Pandolfi, 2001).

In der Literatur wurde für *PLZF* die Expression für verschiedene Zelltypen beschrieben: Ikeda et al. (2005) konnten bei Patienten mit einer degenerativen Veränderung der Wirbelsäule in den sich differenzierenden Osteoblasten eine gesteigerte Expression von *PLZF* feststellen. Von Buaas et al. (2004) und Costoya et al. (2004) wurde *PLZF* eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung von Keimzell-Stammzellen zugeschrieben und von Cook et al. (1995) wurde in der Maus eine Expression von *PLZF* in den Extremitätenknospen festgestellt. Von Fahnenstich et al. (2003) wurde eine Expression von *PLZF* in humanen endometrialen Stromazellen und myometrialen glatten Muskelzellen gezeigt. Außerdem wurde die Expression von *PLZF* in CD34<sup>+</sup>-Zellen und in KG1-Zellen beschrieben (Reid et al., 1995, Chen et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte in frisch aus peripherem Blut isolierten NK-Zellen eine fast 3-mal so starke *PLZF*-Expression wie in CD34<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden, während die *PLZF*-Expression in kultivierten NK-Zellen wesentlich geringer war (Abb. 4.5.1.1).

Bei weiteren Untersuchungen konnte in den NK-Zelllinien NKL, NK3.3 und NK92 keine Expression von *PLZF* nachgewiesen werden.

Wie bereits durch den Vergleich der *PLZF*-Expression in frisch isolierten und kultivierten NK-Zellen zu vermuten war, zeigte sich während der Kultivierung der NK-

---

Zellen ein Rückgang der *PLZF*-Transkripte. Dies ist übereinstimmend mit den Beobachtungen von Shaknovich et al. (1998), dass hematopoetische Vorläuferzellen im Verlaufe der Kultivierung einen deutlichen Rückgang der *PLZF*-Expression zeigen, oder von Good und Tangye (2007), die in B-Zellen ein Herabregulieren von *PLZF* nach deren Aktivierung beobachten konnten. Außerdem wurde beschrieben, dass die Expression von *PLZF* gesenkt wird, sobald in myeloiden Zelllinien, wie HL60 und NB4, die Differenzierung durch Retinolsäure induziert wird (Chen et al., 1993).

### 5.5 Expression von *PLZF*-regulierten Genen in NK-Zellen

Allgemein wird bei der kontinuierlichen Expression von *PLZF* ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase und häufig sogar die Apoptose der Zellen beobachtet (Shaknovich et al., 1998; Ward et al., 2001; Yeyati et al., 1999). Zwei der Gene, für die eine Bindung von *PLZF* nachgewiesen wurde, wird hierbei eine Rolle zugeschrieben; McConnell et al. (2003) vermuten einen Zellzyklusarrest durch die Repression von *c-myc* durch *PLZF*, da es auf diese Weise zu einer Reduktion von *c-myc*-aktivierten Transkripten kommt. Denne et al. (2007) konnten für *c-myc* zeigen, dass es durch eine Inhibition von *PLZF* durch die humanen endogenen Retrovirus-Proteine Np9 und Rec dereprimiert wird, wodurch es zu einer Expressionsänderung von *c-myc*-regulierten Genen kommt. Yeyati et al. (1999) dagegen führen die Wirkung von *PLZF* als negativer Regulator des Zellzyklus auf die Repression von *Cyclin A2* zurück.

Bei den kultivierten NK-Zellen konnte ein Anstieg der *c-myc*-Expression im Verlauf der Kultivierung festgestellt werden. Ebenso wurde für die *Cyclin A2*-Expression gezeigt, dass sie im Verlauf der Kultivierung anstieg, während die *PLZF*-Expression abnahm. Zum Ende der Kultivierung, als die *PLZF*-Expression wieder anstieg, sank die *Cyclin A2*-Expression ab, was mit der sinkenden Proliferation und dem Absterben der NK-Zellen zu diesem Zeitpunkt in Verbindung gebracht werden kann. Somit kann sowohl für *c-myc* als auch für *Cyclin A2* eine Regulation durch *PLZF* in NK-Zellen angenommen werden.

## 5.6 Expression von Histondeacetylasen in kultivierten NK-Zellen

Da PLZF als Repressor durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC) wirkt (David et al., 1998), wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge an *PLZF* und den verschiedenen *HDAC* besteht.

Für einige HDAC wurde eine Interaktion mit PLZF nachgewiesen, so für HDAC1 von David et al. (1998), für HDAC3 von Li et al. (2000) und für HDAC4 von Chauchereau et al. (2004). Während der Kultivierung von NK-Zellen wurde die Expression verschiedener *HDAC* untersucht. Aufgrund der Ergebnisse kann angenommen werden, dass sich die Expression der meisten *HDAC* ähnlich verhält, wie die Expression von *PLZF*, d.h. die Expression ist an Tag 0 am höchsten, sinkt dann ab und steigt zum Ende der Kultivierung wieder an (Abb. 4.5.4.1).

## 5.7 Expression von PLZF auf Proteinebene: NK-Zellen enthalten PLZF-Protein, das während der Kultivierung reduziert wird

Die Expression eines Faktors auf Transkriptebeine spiegelt nicht unbedingt die Expression auf Proteinebene wider, weshalb nach der Untersuchung der Expression von *PLZF* auf mRNA-Ebene die Expression auf Proteinebene untersucht wurde. Nach zahlreichen Veröffentlichungen über den Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge einer bestimmten mRNA und der entsprechenden Proteinmenge (Gygi et al., 1999; Greenbaum et al., 2002) ist nicht immer zu erwarten, dass bei Vorhandensein großer Transkriptmengen auch viel Protein gemessen werden kann. Mit PLZF in NK-Zellen verhielt es sich allerdings so, dass ein Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinmenge beobachtet werden konnte. Hierbei dienten KG1-Zellen, die stark PLZF-Protein exprimieren, als Positivkontrolle. Mittels Western Blot konnte so das PLZF-Protein in NK-Zellen, nicht aber in CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression in der Positivkontrolle, den KG1-Zellen war dabei deutlich stärker als in NK-Zellen. Bei der Untersuchung der PLZF-Proteinexpression in frisch isolierten und kultivierten NK-Zellen stellte sich heraus, dass das PLZF-Protein in kultivierten NK-Zellen gegenüber frisch isolierten NK-Zellen

nicht mehr zu detektieren war. Diese Beobachtungen entsprechen den Beobachtungen auf mRNA-Ebene, wo sich gezeigt hatte, dass *PLZF* in frisch aus peripherem Blut isolierten NK-Zellen deutlich stärker exprimiert wurde, als in kultivierten NK-Zellen.

Es konnte also gezeigt werden, dass das PLZF-Protein in NK-Zellen deutlich stärker exprimiert wird als in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wobei die Expression durch die Kultivierung der Zellen aber stark verringert wird. Beide Beobachtungen stimmen dabei mit der Situation auf Transkriptebene überein, bei der eine starke *PLZF*-Expression bei frisch isolierten NK-Zellen und eine schwächer werdende bei kultivierten NK-Zellen gemessen wurde.

### **5.8 Chromatin-Immunopräzipitation: Bindung von PLZF an PLZF-regulierte Gene in NK-Zellen**

Für den 2DL3-Promotor konnte in CD34<sup>+</sup>-Zellen eine Bindung von PLZF nachgewiesen werden (4.6.3). Da diese Zellen kein 2DL3 exprimieren, ist hier eine Aktivität von PLZF als Repressor vorstellbar. Übereinstimmend damit ist die Beobachtung einer hohen Methylierung, was auf einen "geschlossenen" Chromatinstatus schließen lässt, sowie einer geringen Acetylierung, was auf einen nicht-transkribierten Bereich hinweist und zu einer Aktivität von PLZF als Vermittler von HDACs passt.

In NK-Zellen konnte allerdings nur eine weniger eindeutige Beobachtung gemacht werden, da hier zwar ebenfalls eine deutliche Bindung von PLZF im *2DL3*-Promotor stattfindet, hierbei aber die Acetylierung hoch ist. Da PLZF aber als Repressor durch die Rekrutierung von HDACs wirkt, ist dieses Ergebnis nicht übereinstimmend mit der Expression von 2DL3 in diesen Zellen. Somit konnte nur für CD34<sup>+</sup>-Zellen eine Wirkung von PLZF als Repressor für 2DL3 nachgewiesen werden.

Als PLZF-regulierte Gene sind *Cyclin A2* (Yeyati et al., 1999) und *IL3R $\alpha$*  (Parrado et al., 2004) bekannt, sowie *c-myc* (McConnell et al., 2003). Für die Promotoren von *Cyclin A2* und *IL3R $\alpha$*  konnte in NK-Zellen jeweils eine deutliche Bindung von PLZF mithilfe der ChIP-Methode gezeigt werden (Abb. 4.6.1 und 4.6.2). Für den *c-myc*-Promotor wurde von McConnell et al. ebenfalls mithilfe der ChIP-Methode eine Bindung von PLZF nachgewiesen, in NK-Zellen gelang dies allerdings nicht.

Aufgrund der ChIP-Ergebnisse und übereinstimmend mit der schwachen Expression von *Cyclin A2* und *IL3R $\alpha$* , die in NK-Zellen beobachtet wurde, kann eine Wirkung von PLZF als Repressor für *c-myc*, *Cyclin A2* und *IL3R $\alpha$*  in NK-Zellen angenommen werden.

### 5.9 Identifizierung eines neuen PLZF-Zielgens: ITGB4 (CD104)

Für PLZF wurden bisher nur wenige Bindungsstellen (Li et al., 1997; Yeyati et al., 1999) bzw. Zielgene beschrieben. Eine Bindung und Regulation wurde für *Cyclin A2* (Yeyati et al., 1999), *IL3R $\alpha$*  (Parrado et al., 2004) und *c-myc* (McConnell et al., 2003) gefunden. Durch die ChIP-Methode bot sich die Möglichkeit, die DNA-Fragmente, an die eine Bindung von PLZF in NK-Zellen stattfindet, zu präzipitieren und zu klonieren (ChIP-and-clone), sodass sie anschließend sequenziert werden konnten. Nach einer Präzipitation mit PLZF-Antikörper konnte auf diese Weise *CD104 (ITGB4)*, das für das Integrin beta 4 codiert, als eine neue Bindungsstelle für PLZF identifiziert werden.

Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen und die Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte vermitteln (Hynes, 1987; Ruoslati und Pierschbacher, 1987). Integrin  $\beta_4$  (CD104) assoziiert mit der Integrin  $\alpha_6$  -(CD49f) Untereinheit die beide zusammen den  $\alpha_6\beta_4$ -Komplex bilden. ITGB4 findet sich hauptsächlich auf Epithelzellen und Schwannzellen (Kajiji et al., 1989, Hemler et al., 1989, Sonnenberg et al., 1988). Bisher wurde für die Regulation der ITGB4-Expression von Oldak et al. (2004) eine E2-spezifische Bindestelle im ITGB4-Promotor gefunden, worüber eine Regulation des Promotors durch das humane Papillomavirus Typ 8 (HPV8) erfolgen soll.

Zur Verifizierung der Ergebnisse, die aus der Sequenzierung klonierter ChIP-Produkte erhalten werden, sind mehrere Methoden beschrieben (Weinmann et al., 2001; Nelson et al., 2004; LeBaron et al., 2005), wobei die häufigste eine ChIP-Analyse mit Primern für das Zielgen ist. Auf diese Weise, also mittels Real-time PCR mit Primern für die *ITGB4*-Promotorregion, wurde auch hier die Bindungsstelle überprüft und bestätigt.

---

In der Promotorregion von *ITGB4* konnte eine mögliche Bindungsstelle für PLZF gefunden werden, die mit der PLZF-Bindestelle, die von Li et al. (1997) postuliert wird, übereinstimmt. In anderen Genen wurden andere Zielsequenzen gefunden, so die Sequenz TATGTACAG in *Cyclin A2*, das nach Yeyati et al. (1999) ein Zielgen für PLZF ist. Eine solche Variabilität die Bindungsstellen betreffend ist nicht ungewöhnlich, wie mehrfach beschrieben wurde. Hyde-DeRuyscher et al. (1995) fanden für das Zinkfinger DNA Bindeprotein YY1 41 Zielsequenzen, die alle die core Sequenz 5'-CAT-3' besitzen, flankiert von variablen Regionen. Auf diese Weise kann YY1 die Transkription von vielen verschiedenen Promotoren regulieren. Wang et al. (1993) haben für das Zinkfingerprotein WT1 eine zusätzliche Zielsequenz identifiziert, woraufhin sie WT1 eine Funktion in der Transkriptionsregulation verschiedener wachstumsrelevanter Gene zuschrieben.

Da in den Genen, für die eine Bindung von PLZF nachgewiesen werden konnte, sehr unterschiedliche Zielsequenzen vorhanden sind, kann angenommen werden, dass PLZF an viele verschiedene Promotoren binden kann.

*ITGB4* ist eine wichtige Komponente der Hemidesmosomen, die für eine Anbindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind (Jones et al., 1991; Borradori und Sonnenberg, 1996). Aufgrund seiner Funktion als Adhäsionsmolekül spielt *ITGB4* eine Rolle bei der Zellmigration und somit auch bei der Metastasierung bestimmter Tumore. Außerdem wird es in Zusammenhang mit der Verankerung der Epidermiszellen auf der Basallamina gebracht (Pulkkinen et al., 1998a und b und Vidal et al., 1995). Für Tumorzellen konnten Falcioni et al. (1986) zeigen, dass eine hohe Expression der  $\beta_4$ -Untereinheit mit der Metastasierung korreliert, wobei hier die mechanische Adhäsion für die Metastasierung verantwortlich gemacht wird.

Für *ITG $\beta_3$*  wurde von Felicetti et al. (2004) ein Rückgang der Expression in Melanomzellen beobachtet, in denen *PLZF* überexprimiert wurde, was zusammen mit der Beobachtung, dass *PLZF* in Melanocyten, nicht aber in Melanomzellen exprimiert wird, darauf schließen lässt, dass PLZF als Tumorsupressor wirkt.

Chen und O'Connor (2005) erklären den Zusammenhang von *ITGB4*-Expression und dem mobilen und invasiven Phänotyp von Karzinomzellen mit einer Regulation der mit diesem Phänotyp assoziierten Gene durch *ITGB4*. Sie fanden eine Verstärkung der Expression durch *ITGB4* bei mehreren hundert Genen. Eine Aktivierung des Signaltransduktionsweges über Phosphoinositol-3-OH-Kinase (PI3K) durch *ITGB4*

---

wurde durch mehrere Autoren beschrieben (Shaw et al., 1997; Trusolino et al., 2001) und weist ebenfalls darauf hin, dass die Metastasierung vermutlich nicht nur durch mechanische Adhäsion, sondern auch durch Transkriptionsregulation gefördert wird.

### 5.10 Überexpression von PLZF in NK3.3

Bei einer Überexpression von *PLZF* in der murinen 32Dcl3 Zelllinie wird das Wachstum der Zellen unterdrückt, wobei es zu einem Stillstand des Zellzyklus, zu verringerter Cyclin A2-Expression und zur Ausschüttung eines autokrinen Wachstums-Inhibitions-Faktors kommt (Shaknovich et al., 1998, Yeyati et al., 1999). Außerdem wird die Expression von IL-3R $\alpha$  verringert (Ball et al., 1999).

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von PLZF in NK-Zellen wurde eine Überexpression von *PLZF* in NK3.3-Zellen durchgeführt. Eine Kontrolle der Überexpression fand in Form einer Real-time PCR statt, bei der sich für die NK3.3-Zellen eine etwa 180-fache Expressionssteigerung zeigte. Bei der anschließenden Untersuchung der Expression von *ITGB4* wurde kein Transkript gemessen, was bei einer reprimierenden Wirkung von PLZF auf *ITGB4* zu erwarten war. Da allerdings die *ITGB4*-Expression vor der Überexpression von PLZF nur gering war, lässt sich die Wirkung von PLZF auf *ITGB4* nicht eindeutig bestimmen.

Für NK-L-Zellen konnte die Überexpression mittels Real-time PCR nicht gezeigt werden, während die mit *PLZF* transfizierten NK-Zellen während der Kultivierung schlecht proliferierten und apoptotisch wurden. Ähnliche Beobachtungen wurden an 32DG/GM Zellen bereits von Shaknovich et al. (1998) gemacht. Hier führte die Überexpression von *PLZF* zur Apoptose und das Fortbestehen der übrigen Zellen wurde auf das Wachstum der PLZF-negativen Zellen zurückgeführt. Ebenso stellten Bernardo et al. (2007) eine Hemmung des Zellwachstums und die Induktion der Apoptose durch die Überexpression von *PLZF* in Jurkat-Zellen fest.

Die Rolle von PLZF für die Regulation von *ITGB4* in primären NK-Zellen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Expression war hier in den untransfizierten und den transfizierten Proben gleich niedrig bis nicht vorhanden.

### 5.11 Regulation der Expression von PLZF

Fahnenstich et al. (2003) konnten zeigen, dass die Expression von *PLZF* in endometrialen Stromazellen durch Progesteron und noch stärker durch Dexamethason gesteigert wird. Eine weitere Möglichkeit, die *PLZF*-Expression zu regulieren, ist die Behandlung mit Retinolsäure (RA). Hierbei konnte in HL-60- und NB-4-Zellen eine Differenzierung ausgelöst werden, wobei die Expression von *PLZF* zurückging (Chen et al., 1993). Der gegenteilige Effekt, eine Steigerung der *PLZF*-Expression durch RA, konnte von Cook et al. (1995) für P19-Zellen gezeigt werden.

Da die Genexpression auch durch Chromatinmodifikationen bestimmt wird (Grewal et al., 2003, Jaenisch et al., 2003), wurde die Rolle der Methylierung (durch Kultivierung mit Aza) und der Histonacetylierung (durch Kultivierung mit TSA) für *PLZF* untersucht.

Hierfür wurden NKL- und NK3.3-Zellen verwendet, da diese Zelllinien kein *PLZF* exprimieren. Es konnte eine Induktion der *PLZF*-Expression in NKL-Zellen durch Kultivierung mit TSA erreicht werden, während in NK3.3-Zellen eine Induktion durch Aza erzielt wurde. Die stärkste Steigerung der *PLZF*-Transkriptmenge zeigte sich in beiden Zelllinien durch die Kultivierung mit Aza und TSA zusammen (Abb. 4.9.1 und 4.9.2).

TSA interagiert mit dem katalytischen Zentrum der HDACs, wodurch diese inhibiert werden (Yoshida et al., 1990, Jung, 2001). Da in NKL-Zellen durch Kultivierung mit TSA eine Expression von *PLZF* induziert werden konnte, ist anzunehmen, dass *PLZF* in dieser Zelllinie einen deacetylierten, "geschlossenen" Chromatinstatus besitzt, der durch die chemische HDAC-Inhibition reversibel geöffnet wird.

Aza ist ein Inhibitor der DNA-Methylierung, der kovalent an die Methyltransferase DNMT1 bindet und sie so blockiert, wodurch es bei der weiteren DNA-Replikation zu keiner Methylierung mehr kommen kann (Pietrobono et al., 2002). Die Induktion der

*PLZF*-Expression durch Aza in NK3.3-Zellen lässt also darauf schließen, dass *PLZF* in NK3.3-Zellen durch Hypermethylierung inaktiviert ist.

Somit konnte der Chromatinstatus für *PLZF* in NK3.3- und NKL-Zellen bestimmt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PLZF* durch Aza, TSA und Aza/TSA induzierbar ist, was auf eine epigenetische Regulation von *PLZF* schließen lässt.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Faktoren, die an der Regulation der Expression von Rezeptoren in Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beteiligt sind. Hierzu wurden mithilfe von subtraktiven cDNA-Banken NK- (NK3.3-) und T- (Jurkat-) Zelllinien verglichen, sowie frisch isolierte und kultivierte NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Für NK3.3-Zellen konnten drei Transkriptionsfaktoren (BHLHB2, ITF2, und PSCDBP) als signifikant differentiell exprimiert gegenüber Jurkat-Zellen identifiziert werden. Weiterhin wurden für NK-Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehrere Faktoren erstmalig als differentiell exprimiert identifiziert: SMARCF1, welches die Transkription durch Veränderung der Chromatinstruktur reguliert; TCEB1, das an der Transkription beteiligt ist; EIF2S3, ein an der Translation beteiligter Faktor; sowie vier Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren: RREB1, ZNF211, ZNF236 und PLZF (ZNF145).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Rolle von PLZF (ZNF145), welches 29-fach stärker in NK- als in CD8<sup>+</sup>T-Zellen exprimiert wurde, näher untersucht. Bisher wurde dieser Faktor vor allem als Repressor im Rahmen verschiedener Differenzierungsprozesse (Keimzellentwicklung, Osteogenese) und als Translokationspartner von Retinolsäure-Rezeptor- $\alpha$  bei akuter promyeloischer Leukämie beschrieben. Es zeigte sich, dass PLZF in kultivierten primären NK-Zellen sowie NK-Zelllinien wesentlich schwächer als in frisch isolierten NK-Zellen aus peripherem Blut exprimiert wurde. Untersuchungen zur Genregulation zeigten, dass die Expression von PLZF in den NK-Zelllinien durch chemische Blockade der DNA Methyltransferasen und/oder Histondeacetylasen mit Azacytidin und Trichostatin induziert werden kann.

Die Untersuchung der Expressionskinetik von PLZF zeigte, dass im Verlauf der Kultivierung von ruhenden NK-Zellen mit IL-2 schon nach 24h eine signifikante Abnahme der Transkriptmenge stattfand. Parallel dazu wurde die Expression der bisher bekannten von PLZF regulierten Gene, c-myc, Cyclin A2 und IL-3R $\alpha$  untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge an c-myc und Cyclin A2 im Verlauf der Kultivierung der NK-Zellen erwartungsgemäß zunimmt. Darüberhinaus konnte für Cyclin A2 und IL-3R $\alpha$  in NK-Zellen eine direkte Bindung von PLZF in der Promotorregion mithilfe der ChIP-Technologie nachgewiesen werden. Somit kann für c-myc, Cyclin A2 und IL-3R $\alpha$  eine Regulation durch PLZF in NK-Zellen angenommen werden. Schließlich konnte mithilfe der ChIP-and-clone Technik in NK-Zellen eine Bindung von PLZF an ein neues Zielgen, das Integrin ITGB4 (CD104), nachgewiesen werden, dessen Expression u.a. mit der Metastasierung invasiver Tumoren in Verbindung gebracht wird.

---

**Abstract**

The aim of the present work was the identification of factors which are involved in the regulation of the expression of receptors in natural killer cells (NK cells). NK (NK3.3) and T (Jurkat) cell lines, as well as fresh isolated and cultured primary NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells were compared by establishing subtractive cDNA libraries. For NK3.3 cells three transcription factors (BHLHB2, ITF2, and PSCDBP) could be identified as significant differentially expressed compared to Jurkat cells. Furthermore several factors were identified for the first time as differentially expressed in NK cells compared to CD8<sup>+</sup> T cells: SMARCF1 which regulates gene transcription by altering the chromatin structure; TCEB1 which is involved in transcription; EIF2S3, a factor involved in translation; as well as four zinc finger transcription factors: RREB1, ZNF211, ZNF236 and PLZF (ZNF145).

Based on these results the role of PLZF (ZNF145) which is expressed 29-fold stronger in NK- than in CD8<sup>+</sup> T cells, was examined. Up to now this factor was described as a repressor involved in different differentiation processes (germ cell development, osteogenesis) and as translocation partner of retinoic acid receptor  $\alpha$  with acute promyeloid leukaemia. It appeared that the expression of PLZF in cultured primary NK cells as well as NK cell lines was significantly decreased compared to fresh-isolated NK cells from peripheral blood. Investigations of the genetic regulation showed that the expression of PLZF in the NK cell lines can be induced by chemical blockade of the DNA methyltransferases and/or histone deacetylases with azacytidin and trichostatin.

Investigation of the expression kinetics of PLZF during the cultivation of quiescent NK cells with IL-2 showed a significant decrease in expression after only 24h.

In addition the expression of the up to now known genes regulated by PLZF, c-myc, Cyclin A2 and IL-3R $\alpha$  was examined. As expected an increase in transcript level of c-myc and Cyclin A2 during the cultivation of the NK cells could be shown. By use of the ChIP-technology a direct binding by PLZF in the promoter region could be shown for Cyclin A2 and IL-3R $\alpha$  in NK cells.

Therefore a regulation could be shown for c-myc, Cyclin A2 and IL-3R $\alpha$  by PLZF in NK cells. Finally with the help of the ChIP-and-clone technology, a new target-gene of PLZF was found, the integrin ITGB4 (CD104), whose expression is associated with the metastasis of invasive tumours.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achdout H, Manaster I, et al. (2008). Influenza virus infection augments NK cell inhibition through the reorganization of MHC class I proteins. *J Virol.* Jun 4.
- Aso T, Conaway JW, et al. (1995). "The RNA polymerase II elongation complex." *FASEB J.* 9(14):1419-28. Review.
- Bakker AB, Phillips JH, et al. (1998). "Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL." *J Immunol.* 160(11):5239-45.
- Ball HJ, Melnick A, et al. (1999). "The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase." *Nucleic Acids Res.* 27(20):4106-13.
- Barten R, Torkar M, et al. (2001). "Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors." *Trends. Immunol.* 22: 52 - 57.
- Battistini L, Curti C, et al. (2004). "Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors." *J Org Chem.* 69(7):2611-3.
- Bauer S, Groh V, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science.* 285(5428):727-9.
- Becker KG, Nagle JW, et al. (1995). "Rapid isolation and characterization of 118 novel C2H2-type zinc finger cDNAs expressed in human brain." *Hum. Mol. Genet.* 4: 685 - 691.
- Bernardo MV, Yelo E, et al. (2007). "Identification of apoptosis-related PLZF target genes." *Biochem Biophys Res Commun.* 359(2):317-22. Epub 2007 May 24.
- Biron CA (1997). "Activation and function of natural killer cell responses during viral infections." *Curr. Opin. Immunol.* 9: 24 - 34.
- Boles KS, Nakajima H, et al (1999). "Molecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4." *Tissue Antigens.* 54(1):27-34.
- Bonnema JD, Rivlin KA, et al. (1994). "Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity: positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis." *J. Immunol.* 152:2098.
- Borges L, Hsu M-L, et al. (1997). "A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules." *J. Immunol.* 159: 5192.
- Borradori L, Sonnenberg A (1996). "Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling, and human diseases." *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 647 - 656.
- Bottino C, Falco M, et al. (2001). "NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease." *J Exp Med.* 194(3):235-46. Erratum in: *J Exp Med* 2001 194(5):following 703.
- Bovenschen N, de Koning PJ, et al. (2008). "NK cell protease granzyme M targets (alpha)-tubulin and disorganizes the microtubule network." *J Immunol.* 180(12):8184-91.
- Brady J, Hayakawa Y, et al. (2004). "IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells." *J. Immunol.* 172: 2048-2058.
- Braud V, Jones EY, et al. (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9." *Eur J Immunol.* 27(5):1164-9.
- Brooks AG, Posch PE, et al. (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory NK cell receptor." *J. Exp. Med.* 185: 795 - 800.
- Brown MH, Boles K, et al. (1998). "2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48." *J Exp Med.* 188(11):2083-90.
- Buaas FW, Kirsh AL, et al. (2004). "Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal." *Nature Genetics* 36(6):647-52.
- Budagian V, Bulanova E, et al. (2006). "IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe." *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(4): 259-80.
- Burgess SJ, Marusina AI, et al. (2006). "IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells." *Journal of Immunology* 176(3): 1490-7.
- Cantoni C, Bottino C, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells." *Eur J Immunol* 29(10):3148-59.
- Carretero M, Cantoni C, et al. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a NK cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur. J. Immunol.* 27: 563 - 567.

- Carson WE, Giri JG, et al. (1994). "IL-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor." *J. Exp. Med.* 180: 1395.
- Chang C, Rodríguez A, et al. (1995). "Molekular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lektin superfamily." *Eur J Immunol* 25: 2433-2437.
- Chang C, Dietrich J, et al. (1999). "Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties." *J Immunol.* 163(9):4651-4.
- Chauchereau A, Mathieu M, et al. (2004). "HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF." *Oncogene.* 23(54):8777-84.
- Chen M, O'Connor KL (2005). "Integrin  $\alpha_6\beta_4$  promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells." *Oncogene* 24: 5125 - 5130.
- Colonna M, Brooks EG, et al. (1993). "Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C." *Science.* 260(5111):1121-4.
- Colonna M, Borsellino G, et al. (1993). "HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 15;90(24):12000-4.
- Colonna M, Nakajima H, et al. (1999). "Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells." *J Leukoc Biol Nov;*66(5):718-22.
- Colonna M, Nakajima H, et al. (1999). "A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells." *J. Leukocyte Biol.* 66: 375.
- Cook M, Gould A, et al. (1995). "Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(6):2249-53.
- Cooper MA, Fehninger TA, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *TRENDS in Immunology* 22(11): 633 - 640.
- Cosman D, Müllberg J, et al. (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity.* 14(2):123-33.
- Costoya JA, Hobbs RM et al. (2004). "Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells." *Nature Genetics* 36(6):653-9.
- Daeron M and V. E (1999). "Biology of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing molecules. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs." Daeron M and V. E. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. 244: 1-12.
- Dang CV, Resar LM, et al. (1999). "Function of the c-Myc oncogenic transcription factor." *Exp Cell Res.* 253(1):63-77. Review.
- David G, Alland L, et al. (1998). "Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein." *Oncogene.* 16(19):2549-56.
- De Maria A, Ferraris A, et al. (1997). "Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: Impairment of specific cytolytic functions." *Proc Natl Acad Sci USA, Immunology* 94: 10285-10288.
- De Rham C, Ferrari-Lacraz S, et al. (2007). "The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors." *Arthritis Res Ther.* 9(6):R125.
- Denne M, Sauter M, et al. (2007). "Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and Rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein." *Journal of Virology* 81(11):5607-5616.
- Diatchenko L, Lau Y-FC, et al. (1996). "Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030.
- Diatchenko L, Lukyanov S, et al. (1999). "Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes." *Methods Enzymology* 303: 348-380.
- Di Croce L. (2005). "Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins." *Hum Mol Genet.* Apr 15;14 Spec No 1:R77-84. Review.
- Döhning C, Scheidegger D, et al. (1996). "A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A." *The Journal of Immunology* 156(09): 3098 - 3101.
- Duan DR, Pause A, et al. (1995). "Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein." *Science* 269(5229):1402-6.
- Eberharter A, Becker PB (2002). "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics." *EMBO Rep.* 3: 224 - 229.

- Fahnenstich J, Nandy A, et al. (2003). "Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells." *Molecular Human Reproduction* Vol. 9(10): 611 - 623.
- Falcioni R, Kennel SJ, et al. (1986). "Expression of tumor antigen correlated with metastatic potential of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma clones in mice." *Cancer Res.* 46(11):5772-8.
- Falco M, Marcenaro E, et al. (2004). "Homophilic interaction of NTB1, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells." *Eur J Immunol.* 34(6):1663-72.
- Falk CS, Steinle A, et al. (1995). "Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells." *J. Exp. Med.* 182: 1005 - 1008.
- Felicetti F, Bottero L, et al. (2004). "Role of PLZF in melanoma progression." *Oncogene* 23: 4567 - 4576.
- Ferrini S, Sforzini S, et al. (1994). "The LFA-1/ICAM cell adhesion pathway is involved in tumor-cell lysis mediated by bispecific monoclonal-antibody-targeted T lymphocytes." *Int J Cancer.* 15;56(6):846-52.
- Ferrini S, Cambiaggi A, et al. (1994). "T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function." *Eur J Immunol.* Oct;24(10):2294-8.
- Garrido F (1996). "MHC molecules in normal and neoplastic cells." *Int. J. Cancer* 6: 1 - 10.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, et al. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA-class I phenotypes in human tumours." *Immunol. Today* 18: 89 - 95.
- Gately MK, Renzetti LM, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." *Annu Rev Immunol.* 16:495-521. Review.
- Good KL, Tangye SG. (2007). "Decreased expression of kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(33):13420-5.
- Greenbaum D, Jansen R, et al. (2002). "Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts." *Bioinformatics* 18: 585 - 596.
- Grewal SI, Moazed D (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science* 301: 798 - 802.
- Groh V, Bahram S, et al. (1996). "Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 29;93(22):12445-50.
- Gygi SP, Rochon Y, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Molecular and Cellular Biology* 19: 1720 - 1730.
- Hackett J, Bosma GC, et al. (1986). "Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3427 - 3431.
- Hara T, Miyajima A. (1996). "Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis." *Stem Cells.* 14(6):605-18. Review.
- Hashimoto S, Nagai S, et al. (2003). "Gene expression profile in human leukocytes." *Blood* 101(9):3509-3513.
- Hemler ME, Crouse C, et al. (1989). "Association of the VLA alpha 6 subunit with a novel protein. A possible alternative to the common VLA beta 1 subunit on certain cell lines." *J Biol Chem.* 264(11):6529-35.
- Hinnebusch AG (2000). "Mechanism and regulation of methionyl-tRNA binding to ribosomes." In Sonenberg N, Hershey JWB and Mathews MB (eds.), "Translational Control of Gene Expression." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 185 - 243.
- Hochstrasser M (1996). "Protein degradation or regulation: Ub the judge." *Cell.* 84(6):813-5. Review.
- Hochstrasser M (1998). "There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation." *Genes Dev.* 12(7):901-7.
- Holmes DI, Wahab NA, et al. (1999). "Cloning and characterization of ZNF236, a glucose-regulated Kruppel-like zinc-finger gene mapping to human chromosome 18q22-q23." *Genomics* 15: 105 - 109.
- Houchins JP, Yabe T, et al. (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." *J Exp Me.* 173(4):1017-20.
- Houchins JP, LanierLL, et al. (1997). "Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C." *J. Immunol.* 158: 3603 - 3609.
- Huang JM, Kim JD, et al. (2006). "An improved cloning strategy for chromatin-immunoprecipitation-derived DNA fragments." *Anal Biochem.* 356(1):145-7.

- Hyde-DeRuyscher RP, Jennings E, et al. (1995). "DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1." *Nucleic Acids Research* 23(21): 4457 - 4465.
- Hyman LE, Kwon E, et al. (2002). "Binding to Elongin C inhibits degradation of interacting proteins in yeast." *J Biol Chem.* 277(18):15586-91.
- Hynes RO (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." *Cell.* 1987 Feb 27;48(4):549-54. Review.
- Ikeda R, Yoshida K, et al. (2005). "The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1." *J Biol Chem.* 280(9):8523-30.
- Inoue H, Furukawa T, et al. (2002). "Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 277: 41674 - 41685.
- Inoue H, Miyaji M, et al. (2002). "Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C- $\gamma$  following CD2 stimulation." *Eur. J. Immunol.* 32: 2188 - 2198.
- Jacobs R, Hintzen G, et al. (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." *Eur J Immunol.* 31(10):3121-7.
- Jaenisch R, Bird A (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nature Genetics* 33: 245 - 254.
- Jones JCR, Kurpakus MA, et al. (1991). "A function for the intergrin  $\alpha_6\beta_4$  in the hemidesmosome." *Cell Regul.* 2: 427 - 438.
- Jung M (2001). "Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents." *Current Medical Chemistry* 8: 1505 - 1511.
- Kajiji S, Tamura RN, et al. (1989). "A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors." *EMBO J.* 8(3):673-80.
- Kasaian MT, Whitters MJ, et al. (2002). "IL-21 limits NK cell responses and promote antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity." *Immunity* 16: 559.
- Kornbluth J, Flomenberg N, et al. (1982). "Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells." *J Immunol.* 129(6):2831-7.
- Kubin MZ, Parshley DL, et al. (1999). "Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48." *Eur J Immunol* 29: 3466-3477.
- Lanier LL, Testi R, et al. (1989). "Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule." *J Exp Med.* Jun 1;169(6):2233-8.
- Lanier LL (1998). "NK cell receptors." *Annu. Rev. Immunol.* 16: 359 - 393.
- Lazetic S, Chang C, et al. (1996). "Human Natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulphide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." *J. Immunol.* 157: 4741 - 4745.
- LeBaron MJ, Xie J, et al. (2005). "Evaluation of genome-wide chromatin library of STAT5 binding sites in human breast cancer." *Molecular Cancer* 4:6
- Lee N, Llano M, et al. (1998). "HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(9):5199-204.
- Li JY, English MA, et al. (1997). "Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein." *The Journal of Biological Chemistry* 272(36):22447-22455.
- Li J, Wang J, et al. (2000). "Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3." *The EMBO Journal.* 19(16):4342-4350.
- Litwin V, Gumperz J, et al. (1994). "NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules." *J Exp Med.* 180(2):537-43.
- Ljunggren G-H and Kärre K (1990). "In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition." Review, *Elsvier Science Publisher* 11(7): 237 - 244.
- Long EO. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." *Annu Rev Immunol.* 17:875-904. Review.
- Loza MJ, Metelitsa LS, et al. (2002). "NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production." *Eur J Immunol.* 32(12):3453-62.
- Loza MJ and P. B (2004). "Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN." *International Immunology* 16(1): 23 - 32.
- López-Botet M, Pérez-Villar JJ, et al. (1997). "Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition on HLA class I molecules." *Immunological Reviews* 155: 165-174.

- Matikainen S, Paananen A, et al. (2001). "IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12." *Eur J Immunol.* 31(7):2236-45.
- Melnick A, Licht JD. (1999). "Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia." *Blood.* 93(10):3167-215. Review.
- Mingari MC, Vitale C, et al. (1995). "Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production." *Int Immunol.* 7(4):697-703.
- Mingari MC, Schiavetti F, et al. (1996). "Human CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations." *Proc Natl Acad Sci USA* 93(22):12433-8.
- Mingari MC, Ponte M, et al. (1997). "HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells." *Int. Immunol.* 9: 485 - 491.
- Mombaerts P, Iacomini J, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* 68: 869 - 877.
- Moretta A, Tambussi G, et al. (1990). "A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> natural killer cells. Role in cell activation of cytolytic function." *J Exp Med* 171 (3):695-714.
- Moretta A, Vitale M, et al. (1993). "P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities." *J Exp Med* 178(2):597-604.
- Moretta A, et al. (1994). "Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles." *J. Exp. Med.* 180: 545 - 555.
- Moretta A, Sivori S, et al. (1995). "Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells." *J Exp Med* 182(3):875-84.
- Moretta A, et al. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." *Annu. Rev. Immunol.* 14: 619 - 648.
- Moretta A, Biassoni R, et al. (1997). "Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes." *Immunological Reviews* 155: 105-117.
- Moretta A, et al. (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity." *Immunol. Today* 21: 228 - 234.
- Moretta A, Bottino C, et al. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Annu. Rev. Immunol.* 19: 197 - 223.
- Nagler A, Lanier LL, et al. (1989). "Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells." *J Immunol.* 143(10):3183-91.
- Nakajima H, Tomiyama H, et al. (1995). "Inhibition of gamma delta T cell recognition by receptors for MHC class I molecules." *J Immunol.* 155(9):4139-42.
- Nakajima H, Cella M, et al. (1999). "Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48." *Eur J Immunol.* 29:1676-83.
- Nelson EA, Walker SR, et al. (2004). "Isolation of unique STAT5 targets by chromatin immunoprecipitation-based gene identification." *The Journal of Biological Chemistry* 279 : 54724 - 54730.
- Obata-Onai A, Hashimoto S, et al. (2002). "Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes." *International Immunology* 14(10):1085-1098.
- Olcese L, Cambiaggi A, et al. (1997). "Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells." *J Immunol* 158(11):5083-6.
- Oldak M, Smola H, et al. (2004). "The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses  $\beta$ 4-Integrin expression in primary human keratinocytes." *Journal of Virology* 78: 10738 - 10746.
- Pagano M, Pepperkok R, et al. (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." *EMBO J.* 11(3):961-71.
- Pain VM (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." *Eur. J. Biochem.* 236: 747 - 771.
- Pandolfi PP (2001). "Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia." *Human Molecular Genetics* 10(7):769-775.
- Parrado A, Robledo M, et al. (2004). "The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes." *PNAS* 101(7):1898-1903.

- Pende D, Biassoni R, et al. (1996). "The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterised by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer." *J Exp Med* 184(2):505-18.
- Pende D, Parolini S, et al. (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." *J Exp Med.* 190(10):1505-16.
- Perez SA, Mahaira LG, et al. (2006). "Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations." *Int. Immunology* 18(1): 49-58.
- Perussia B (1998). "Fc receptors on natural killer cells. Specificity, Function, and Development of NK Cells." Kärre K, and C. M. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 63-88.
- Pessino A, Sivori S, et al. (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." *J Exp Med.* 188(5):953-60.
- Phillips JH, Gumperz JE, et al. (1995). "Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes." *Science.* 268(5209):403-5.
- Pietrobono R, Pomponi MG, et al. (2002). "Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine." *Nucleic Acids Research* 30: 3278 - 3285.
- Ploegh HL (1998). "Viral strategies of immune evasion." *Science* 280: 248 - 253.
- Proud CG (1994). "Peptide-chain elongation in eukaryotes." *Mol. Biol. Rep.* 19: 161 - 170.
- Pulkkinen L, Bruckner-Tuderman L, et al. (1998a). "Compound heterozygosity for missense mutation (L156P) and nonsense (R554X) mutations in the beta-4 integrin gene (ITGB4) underlies mild, nonlethal phenotype of epidermolysis bullosa with pyloric atresia." *American Journal of Pathology* 152: 935 - 941.
- Pulkkinen L, Rouan F, et al. (1998b). "Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense." *American Journal of Human Genetics* 63: 1376 - 1387.
- Reid A, Gould A, et al. (1995). "Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors." *Blood* 86(15): 4544 - 4552.
- Reiter Z. (1993). "Interferon--a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity." *J Interferon Res.* 13(4):247-57. Review.
- Roda JM, Parihar R, et al. (2006). "Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets." *J Immunol.* 177(1):120-9.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science.* 238(4826):491-7. Review.
- Salcedo TW, Azzoni L, et al. (1993). "Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells." *J Immunol* 151(5):2511-20.
- Salvesen GS, Dixit VM (1997). "Caspases: Intracellular signaling by proteolysis." *Cell* 91: 443 - 446.
- Sanchez-Diaz A, Blanco MA, et al. (2001). "HBP2: a new mammalian protein that complements the fission yeast MBF transcription complex." *Curr. Genet.* 40: 110 - 108.
- Santourlidis S, Trompeter H-I, et al. (2002). "Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells." *The Journal of Immunology* 169: 4253 - 4261.
- Santourlidis S, Graffmann N, et al (2008). "Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells." *J Immunol.* 180(1):418-25.
- Sartorius U, Schmitz I, et al. (2001) "Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis." *ChemBiochem* 2: 20-29.
- Schneider U, Schwenk HU, et al. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." *Int J Cancer* 19: 621 - 626.
- Scott P, Trinchieri G. (1995). "The role of natural killer cells in host-parasite interactions." *Curr Opin Immunol.* 7(1):34-40. Review.
- Shaknovich R, Yeyati PL, et al. (1998). "The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis." *Molecular Cell Biology* 18: 5533 - 5545.
- Shaw LM, Rabinovitz I, et al. (1997). "Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion." *Cell* 26: 949 - 960.
- Shinkai Y, Rathbun G, et al. (1992). "RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* 68: 855 - 867.

- Sitterlin D, Tiollais P, et al. (1997). "The RAR $\alpha$ -PLZF chimera associated with acute promyelocytic leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain." *Oncogene* 14:1067-1074.
- Sivori S, Vitale M, et al. (1996). "CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies." *Eur J Immunol.* 26(10):2487-92.
- Sivori S, Parolini S, et al. (2000). "2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation." *Eur J Immunol.* 30(3):787-93.
- Sivori S, Cantoni C, et al. (2003). "IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors." *Eur J Immunol.* 33(12):3439-47.
- Sonnenberg A, Modderman PW, et al. (1988). "Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6." *Nature* 336(6198):487-9.
- Speiser DE, Valmori D, et al. (1999). "CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients." *Eur J Immunol.* 29(6):1990-9.
- Strengell M, Matikainen S, et al. (2003). "IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells." *The Journal of Immunology* 170: 5464 - 5469.
- Takaoka AS, Yamada T, et al. (1998). "Cloning and characterization of the human  $\beta$ 4-Integrin gene promoter and enhancers." *The Journal of Biological Chemistry* 273(50):33848-33855.
- Thiagalingam A, De Bustros A, et al. (1996). "RREB-1, a novel zinc finger protein, is involved in the differentiation response to ras in human medullary thyroid carcinomas." *Molecular and Cellular Biology* 16: 5335 - 5345.
- Trincheri G (1990). "Biology of natural killer cell." *Acv. Immunol.* 47: 187 - 376.
- Trompeter H-I, Weinhold S, et al. (2003). "Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection." *Journal of Immunological Methods* 274: 245 - 256.
- Trusolino L, Bertotti A, et al. (2001). "A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth." *Cell* 30: 643 - 654.
- Toomey JA, Gays F, et al., (2003). "Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro". *J. Leukocyte Biol.* 74: 233-242.
- Uhrberg M, Valiante NM, et al. (2001). "The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical  $\alpha/\beta$  TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns." *The Journal of Immunology* 166: 3923-3932.
- Vidal F, Aberdam D, et al. (1995). "Integrin beta-4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia." *Nature Genetics* 10: 229 - 234.
- Vilches C, Parham P (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." *Annu. Rev. Immunol.* 20: 217 - 251.
- Vitale M, Bottino C, et al. (1998). "Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis." *J Exp Med.* 15:187(12):2065-72.
- Vitale M, Falco M, et al. (2001). "Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells." *Eur J Immunol.* 31(1):233-42.
- Wang ZY, Qiu QQ, et al. (1993). "A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8896 - 8900.
- Ward JO, McConnell MJ, et al. (2001). "The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D3 receptor." *Blood* 98(12):3290-3300.
- Warren HS, Kinnear BF, et al. (1993). "Human natural killer (NK) cells: requirements for cell proliferation and expansion of phenotypically novel subpopulations." *Immunology and Cell Biology* 71: 87.
- Weinmann AS, Bartley SM, et al. (2001). "Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters." *Molecular and Cellular Biology* 21: 6820 - 6832.
- Welsh GI, Miyamoto S, et al. (1996). "T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3." *The Journal of Biological Chemistry* 271: 11410 - 11413.
- Wende H, Colonna M, et al. (1999). "Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4." *Mammalian Genome* 10: 154-160.
- Workman JL, Kingston RE (1998). "Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation." *Annu. Rev. Biochem.* 67: 545 - 579.
- Wu J, Song Y, et al. (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." *Science.* 285(5428):730-2.

Yeyati PL, Shaknovich R, et al. (1999). "Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A." *Oncogene* 18:925-934.

Yoshida T, Ishikawa I, et al. (1999). "An activation-responsive element in single C motif-1/lymphotactin promoter is a site of constitutive and inducible DNA-protein interactions involving nuclear factor of activated T cell." *The Journal of Immunology* 163: 3295 - 3303.

Young NT, Uhrberg M, et al. (2001). "Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL." *The Journal of Immunology* 166: 3933-3941.

Zhang L, Zhao J, et al. (1999). "A human Raf-responsive zinc-finger protein that binds to divergent sequences." *Nucleic Acids Research* 27: 2947 - 2956.

Zhang T, Xiong H, et al. (1999). "Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11422 - 11427.

Zhu Y, Qi C, et al. (2001). "Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function." *PNAS* 98(18): 10380 - 10385.

## **Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. Markus Uhrberg bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Peter Wernet danke ich dafür, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika durchführen konnte.

Herrn Dr. Torsten Tonn, Blutspendezentrale DRK Hessen Frankfurt, und Frau PD Dr. Gesine Kögler, Nabelschnurblutbank der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, danke ich für die Bereitstellung der Buffy Coats und der Nabelschnurblute.

Bei Frau Gabi Tilmann möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierungen bedanken, Dr. Britta Eisermann danke ich für die Hilfe bei der Zellkultur und die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Sandra Weinhold möchte ich für das Lesen des Manuskriptes und für ihr Interesse am Gelingen der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Julia Christ, die mich durch ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und durch ihre Bereitschaft, Ergebnisse zu diskutieren immer wieder motiviert hat.

Desweiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und vielfältige Hilfe bedanken. Ohne euer Babysitten wären die letzten Korrekturen und Besprechungen schwierig geworden.

Frau Dr. Birgit Gellersen, Endokrinologikum Hamburg, danke ich für die Bereitstellung des Vektors für die PLZF-Expression.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung und Anteilnahme bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank Jörg für die frühere gute Zusammenarbeit und für alles, was sich daraus ergeben hat!

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, 2008

Christa Henger