

**Molekulargenetische Charakterisierung der
RT1.C/E-Region im MHC der Ratte**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation**

von

**Dipl.-Biochem. Björn Bortfeldt
geboren am 11. Februar 1965 in Erlangen**

2000

Referent:	Prof. Dr. W. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. M. Martin
Tag der Promotion:	30. Juni 2000

Meiner Familie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Klempnauer, der es mir ermöglichte, diese inhaltlich und arbeitstechnisch interessante Fragestellung an seiner Klinik zu bearbeiten.

Für die Übernahme des Referates und die große Unterstützung durch viele hilfreiche Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. W. Müller. Ohne seine vorbildliche Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Martin bedanke ich mich besonders herzlich für die engagierten Diskussionen und die stets weiterführende Kritik. Seine Denkanstöße trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Frau Dr. D. Lambracht-Washington bedanke ich mich für ihre kompetente Unterstützung und die zahlreichen anregenden, wissenschaftlichen Diskussionen. Für die ständige Bereitschaft zum Gespräch über seine Sichtweise grundsätzlicher Aspekte der Thematik und das häufig bekundete Interesse an dieser Arbeit danke ich Dr. K. Wonigeit.

Besonderer Dank gilt A. Kiefeld, T. Ebensen, Dr. H. J. Dulat, Dr. J. Hundrieser und Dr. U. Kyas für ihren fachlichen Rat bei der praktischen Durchführung der Experimente und die vielen hilfreichen Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Probleme. Den Mitarbeitern des Institutes, allen voran Frau H. Düvel, danke ich für ihre freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Auch Dr. D. Wedekind vom Institut für Versuchstierkunde, Dr. W. Küster von der Abteilung für Biophysikalische Chemie, Dr. H. Flathman von der Klinischen Forschergruppe Mukoviszidose, Prof. Dr. E. Günther und Dr. L. Walter in Göttingen sowie Dr. C. Amadou in Dallas/USA danke ich für ihre Hilfe durch Reagenzien sowie zahlreiche Ratschläge.

Meiner Familie, vor allem aber meiner Frau, danke ich für die liebevolle Unterstützung. Meinen Söhnen danke ich für die große Geduld mit ihrem Vater.

Zusammenfassung

Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) spielen bei Vertebraten eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Klassische Klasse I Gene (Klasse Ia) kodieren für ubiquitär exprimierte, polymorphe, peptidbindende Proteine, die die Erkennung von intrazellulären Antigenen durch zytotoxische T-Lymphozyten vermitteln. Zwar sind die Klasse Ia Gene gut untersucht, die Mehrheit der MHC Gene stellen jedoch die nichtklassischen Klasse Ib Gene. Da deren überwiegender Teil bisher nicht charakterisiert wurde, konnte ihre Funktion noch immer nicht geklärt werden. Im MHC der Ratte (*RTI* Nomenklatur) werden Klasse Ia und Ib Moleküle in zwei voneinander getrennten Regionen kodiert. Während die zentromer gelegene *RTI.A* Region die Klasse Ia Gene enthält, sind die Klasse Ib Gene in der telomeren *RTI.C/E* Region lokalisiert. Für deren Klasse Ib Genprodukte liegen zahlreiche Hinweise auf Funktionen bei der T-Zellrestriktion und der Regulation alloreaktiver NK-Zellen vor. Die Zuordnung erkannter Funktionen zu einzelnen Genen wird durch die noch unvollständige Kenntnis der Struktur dieser Region erschwert. Ziel dieser Arbeit ist daher die Aufklärung des strukturellen Aufbaus der *RTI.C/E*-Region unterschiedlicher *RTI* Haplotypen.

Mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) kann die genomische Deletion des mutanter *RTI*-Haplotyps *lm1* in die Nähe des Markergens *Pou5f1* im proximalen Bereich von *RTI.C/E* kartiert werden. Die Deletionsgröße wird auf etwa 500 kb bestimmt. Die kleinere, knapp 80 kb umfassende Deletion des mutanten Haplotyps *lm3* liegt vollständig innerhalb des bei *lm1* deletierten Bereiches. Die PFGE Charakterisierung eines weiteren, neu entdeckten mutanten Haplotyps (*um1*) kartiert dessen Rekombinationspunkt zwischen die Marker *Bat1* und *Pou5f1* und somit in die proximale *RTI.C/E*-Region. Zusätzliche RFLP-Analysen mit verschiedenen Klasse I Sonden zeigen, daß in *um1* aufgrund eines ungleichen Crossing-over nahezu der gesamte chromosomale Bereich zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1* verdoppelt ist.

Eine Klasse Ib Genfamilie der *RTI.C/E*-Region wird durch Sonden aus dem in *lm1* deletierten *I1/3R*-Gen definiert. Mitglieder dieser Familie werden durch PCR- und RFLP-Analysen in allen untersuchten *RTI*-Haplotypen nachgewiesen, wobei ihre Anzahl zwischen 7 Genen in *RTI^{lv1}* und 18 in *RTI^u* variiert. Anhand eines 44 bp Motivs in der 3' untranslatierten Region dieser Gene werden zwei Subsets der Familie unterschieden. Diese sind in gemischter Folge verteilt in der proximalen *RTI.C/E*-Region lokalisiert, was auf eine Entstehung der Familie durch mehrfache Duplikation einer Gruppe von Ursprungsgenen hindeutet.

Die Charakterisierung der mutanten Haplotypen zeigt die besondere Dynamik der telomeren Klasse Ib Region auf und erleichtert das Verständnis ihrer funktionellen Besonderheiten. Die PFGE-Kartierung einer Reihe von Markergenen des MHC der Ratte und die dabei gefundenen Polymorphismen erweitern das zur Verfügung stehende Instrumentarium für weiterführende Analysen dieser Multigenfamilie und ermöglichen zudem einen speziesübergreifenden Vergleich mit den MHC Regionen von Mensch und Maus.

Stichworte:

MHC Klasse Ib, *RTI.C/E* Region, Ratte

Abstract

The genes of the major histocompatibility complex (MHC) play a cardinal role in the immune defense of vertebrates. Classical MHC class I genes (class Ia) encode ubiquitously expressed polymorphic peptide binding chains which mediate the recognition of intracellular antigens by cytotoxic T cells. Much is known about those class Ia molecules, but the majority of MHC genes is represented by the nonclassical class Ib genes. Up to now the greater part of them has not been characterized. Thus, their function remains uncertain. The MHC of the rat (*RTI* system) contains two different class I coding regions. The centromeric class I region (*RTI.A*) encodes class Ia molecules, whereas all the class Ib genes are located in the telomeric class I region (*RTI.C/E* region). As indicated by functional studies, at least some of the *RTI.C/E* gene products bind and present peptides to T cells or regulate NK cell alloreactivity. One major problem preventing further understanding of the function of distinct MHC class Ib molecules is the incomplete knowledge about the structure of the *RTI.C/E* region.

To overcome this problem, this work focuses on the structural analysis of the *RTI.C/E* region in different *RTI* haplotypes. Using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) the genomic deletion of the *RTI* mutant haplotyp *lm1* is mapped in the proximal *RTI.C/E* region close to the marker gene *Pou5f1*. Further analysis reveals that the *lm1* deletion encompasses about 500 kb and includes the smaller deletion of the *lm3* mutant which covers about 80 kb. The PFGE characterization of the newly found *RTI* mutant haplotype *um1* defines its recombinational breakpoint in the same portion of the *RTI.C/E* region as the breakpoints of *lm1* and *lm3*. Additional RFPL analysis with several class I probes show that virtually the whole chromosomal segment between *Bat1* and *Pou5f1* is duplicated in *um1* as a result of an unequal crossing over during recombination.

One of the class Ib genes known to be lost in *lm1* is *I1/3R*. A class Ib gene family is defined by hybridization probes from *I1/3R*. Several members of this family are shown in each *RTI* haplotype tested by PCR and RFLP analysis. Between haplotypes their total numbers vary in a range from 7 genes in *RTI^{lv1}* up to 18 in *RTI^u*. Two subsets of the family can be distinguished by a 44 bp motive in the 3' untranslated region of their genes. Findings in the mutant haplotypes clearly demonstrate that both subsets spread over the proximal *RTI.C/E* region in mixed order and suggest multiple duplications of an ancestral group or pair of genes.

The presented results, in particular the characterization of the mutant haplotypes, reveal remarkable changes in the extent of the telomeric MHC class Ib region of the rat. The PFGE mapping of several framework markers in *RTI.C/E* allow an interspecies comparison between the MHC class I regions of man, mouse and rat. Furthermore, as well as the described polymorphisms, they provide additional means for further investigation of the large class I multigene family and therefore should lead to a better understanding of the functional properties of the *RTI.C/E* region.

keywords: MHC class Ib, *RTI.C/E* region, rat

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex	1
1.1.1 MHC Klasse I Moleküle	1
1.1.2 MHC Klasse I Genregionen in verschiedenen Spezies.....	4
1.1.3 Funktionelle Bedeutung der Klasse Ib Gene in <i>RT1.C/E</i>	11
1.2 Fragestellung dieser Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Versuchstiere	14
2.1.2 Bakterienstämme	15
2.1.3 Vektoren	15
2.1.4 PCR-Primer	16
2.1.5 Sonden.....	16
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.7 Enzyme, Kits und Chemikalien	19
2.1.8 Verbrauchsmaterial	21
2.1.9 Geräte	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Analyse von Restriktionslängenpolymorphismen im MHC der Ratte	23
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Lebergewebe.....	23
2.2.1.2 Restriktionsverdauung der DNA.....	25
2.2.1.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	26
2.2.1.4 Transfer der DNA auf Membranfilter	28
2.2.1.5 Hybridisierung der filtergebundenen DNA	29
2.2.1.6 Hybridisierung von DNA in Agarosegelen	34
2.2.2 Untersuchung von MHC Klasse I Genen mittels Polymerasekettenreaktion	35
2.2.2.1 PCR-Analyse genomischer DNA	35
2.2.2.2 PCR-Analyse von Cosmid- und Plasmid-DNA.....	35
2.2.2.3 TA-Klonierung von PCR-Produkten.....	36

2.2.3	Untersuchung klonierter DNA.....	36
2.2.3.1	Präparation von Cosmid- oder Plasmid-DNA	36
2.2.3.2	Restriktionsverdauung klonierter DNA.....	38
2.2.3.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.2.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA.....	38
2.2.3.5	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	39
2.2.3.6	Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA	40
2.2.3.7	Sequenzierung von Restriktionsfragmenten	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Bestimmung von Lage und Größe der genomischen Deletionen der <i>RT1</i> -Haplotypen <i>lm1</i> und <i>lm3</i>	43
3.1.1	Untersuchung der zentromeren Grenze der <i>RT1.C/E</i> -Region	44
3.1.2	Lokalisation der genomischen Deletion im <i>RT1</i> -Haplotyp <i>lm1</i>	46
3.1.3	Größenbestimmung der genomischen Deletionen der <i>RT1</i> -Haplotypen <i>lm1</i> und <i>lm3</i>	52
3.2	Untersuchung der <i>11/3R</i> -Familie.....	56
3.2.1	Nachweis von zwei Subpopulationen der <i>11/3R</i> -Familie	57
3.2.2	Nachweis <i>11/3R</i> -homologer Gene in verschiedenen <i>RT1</i> -Haplotypen.....	72
3.2.3	Charakterisierung der <i>11/3R</i> -Familie in den mutanten <i>RT1</i> -Haplotypen <i>lm1</i> und <i>lm3</i>	75
3.2.4	Charakterisierung der <i>11/3R</i> -Familie im mutanten <i>RT1</i> -Haplotyp <i>lm2</i>	86
3.2.5	Verteilung der <i>11/3R</i> -homologen Klasse I Gene innerhalb der <i>RT1.C/E</i> -Region. 93	
3.3	Untersuchung eines neuen mutanten <i>RT1</i> -Haplotyps in der <i>RT1.C/E</i> -Region (<i>RT1^{uml}</i>). 97	
3.3.1	Kartierung des Rekombinationspunktes von LEW.1UM1 mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese	97
3.3.2	Charakterisierung der <i>RT1.C/E</i> -Region von LEW.1UM1 mittels RFLP-Analyse	101
3.3.3	Vergleich von LEW.1UM1 mit den Deletionsmutanten der <i>RT1.C/E</i> -Region... 111	
4	Diskussion	112
4.1	Organisation des proximalen Bereiches der <i>RT1.C/E</i> -Region	112
4.2	Die <i>11/3R</i> -Familie.....	120
4.3	Expansion und Kontraktion der <i>RT1.C/E</i> -Region	128
5	Zusammenfassung.....	131
6	Literatur	132

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaar
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
cDNA	complementary DNA, „copy-DNA“
CTL	zytotoxische T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
LT	Lymphotoxin
mAK	monoklonaler Antikörper
Mb	Megabasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NC	nicht kodierend
NK	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Puls-Feld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard salt concentration
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT1	Haupthistokompatibilitätskomplex der Ratte
UpM	Umdrehungen pro Minute
URL	Uniform Resource Locator
utr	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Jeder Organismus steht vor der existenziellen Aufgabe, sich vor schädigenden Angriffen durch eingedrungene Pathogene oder von entarteten bzw. fehlregulierten endogenen Faktoren zu schützen. Hierbei ist für eine gerichtete Abwehr die spezifische Erkennung der potentiellen Gefahrenquellen von fundamentaler Bedeutung. Das Immunsystem der Säugetiere erfüllt die dabei zentrale Funktion der Antigenverarbeitung und -präsentation in einem komplexen Prozeß unter Zuhilfenahme einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle und Mechanismen. Die Gene vieler hieran beteiligter Moleküle sind in einem besonderen Abschnitt des Genoms konzentriert, dem Haupthistokompatibilitätskomplex oder MHC (nach *engl.* Major Histocompatibility Complex).

In den Organismus eingedrungene Pathogene können sich grundsätzlich in drei unterschiedlichen Kompartimenten aufhalten und vermehren: intrazellulär entweder im Zytosol oder im vesikulären System der Zelle, oder aber in extrazellulären Räumen. Entsprechend der Herkunftskompartimente der Antigene unterscheiden sich die Wege ihrer Verarbeitung bzw. Prozessierung. Den Reaktionswegen ist jedoch das Prinzip gemeinsam, Proteine und größere Peptide durch bestimmte Proteasen in kleine Peptidfragmente mit einer Länge von etwa 8–15 Aminosäureresten zu spalten, die nach Bindung an darauf spezialisierte Moleküle schließlich an die Zelloberfläche verbracht und dort den unterschiedlichen Effektorzellen des Immunsystems präsentiert werden.

Diese MHC-kodierten Zelloberflächenmoleküle, die am Ende der Antigenprozessierung die Bindung und Präsentation antigenen Peptide übernehmen, bilden in ihrer Gesamtheit die große Gruppe der Haupttransplantations- oder Haupthistokompatibilitätsantigene. Man unterteilt sie nach ihrer Struktur, Funktion und Expression in zwei Hauptgruppen oder Klassen: die auf nahezu allen Körperzellen exprimierten MHC Klasse I Moleküle und die vornehmlich auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen nachweisbaren MHC Klasse II Moleküle.

1.1.1 MHC Klasse I Moleküle

Die biologische Funktion der MHC Klasse I Moleküle ist die Bindung und Präsentation endogener und exogener Peptide für die Erkennung durch Antigenrezeptoren von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Klasse I

Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, bestehend aus einer MHC-kodierten schweren α -Kette und einer leichten β -Kette, dem nicht MHC-kodierten β_2 -Mikroglobulin (β_2 M). Bei vergleichbarer Exon/Intron-Organisation ihrer Gene besitzen die schweren α -Ketten in der Regel drei extrazelluläre Domänen ($\alpha 1 - \alpha 3$), sowie einen transmembranösen und einen zytosolischen Abschnitt. Die nicht kovalente Bindung von β_2 M erfolgt hauptsächlich an der konservierten $\alpha 3$ -Domäne [1]. Die Peptidbindungsgrube wird von den hochpolymorphen Bereichen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne gebildet [2-4].

Verschiedene Klasse I Moleküle binden aufgrund der Polymorphismen im Bereich der Bindungsgrube ein jeweils unterschiedliches Repertoire von Peptiden, bei denen an einzelnen Positionen, den sogenannten Ankerpositionen, bevorzugt bestimmte Aminosäuren auftreten. Diese Ankerpositionen variieren zwischen den einzelnen Klasse I Molekülen. Dies zeigte unter anderem die Analyse der von verschiedenen immunopräzipitierten Klasse I Molekülen durch Säurebehandlung eluierten Peptide. Für *H-2K^d* und *HLA-A2.1* sind dies die Positionen 2 und 9 des gebundenen Nonamers, in *H-2K^b* dagegen die Positionen 5 und 8 und für *H-2D^b* sind es die Positionen 5 und 9 [5]. Auch in der Länge der bevorzugten Peptide können sich die einzelnen Klasse I Moleküle unterscheiden. In der Ratte unterscheidet sich zum Beispiel das Klasse Ia Molekül *RTI.A^a* mit einer bevorzugten Peptidlänge von 9–15 Aminosäureresten von dem *RTI.AI^c* Molekül, das mit einer bevorzugten Länge von 9–12 Resten ein engeres Peptidspektrum bindet [6].

Die bisher bekannten Peptidmotive von Klasse I und Klasse II Molekülen unterschiedlicher Spezies sind in der SYFPEITHI-Datenbank¹ zusammengetragen, die frei über das Internet zugänglich ist [7]. Vergleiche der eluierten Peptide von verschiedenen humanen Klasse I und Klasse II Molekülen zeigten deutliche Unterschiede auf [8]. Die von Klasse I Molekülen präsentierten Peptide stammen in der Regel aus hoch konservierten, hydrophilen und universell exprimierten Proteinen. Die Peptide selbst sind hydrophob und sogar noch stärker konserviert als ihre Ursprungsproteine. Demgegenüber sind die von Klasse II Molekülen präsentierten Peptide sowie ihre Ursprungsproteine deutlich weniger konserviert.

Woher stammen die an Klasse I gebundenen Peptide? Es sind hierfür drei unabhängige Mechanismen beschrieben worden. Der erste und bedeutenste Weg ist der vom Peptidtransporter TAP (Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung) abhängige, über den

¹ URL: <http://www.uni-thuebingen.de/uni/kxi>

endogene Peptide aus dem Cytosol ins endoplasmatische Retikulum (ER) verbracht werden, wo sie an die Klasse I Moleküle binden [9]. Zwei weitere Mechanismen zeigen, daß Klasse I Moleküle auch mit exogenen Peptiden beladen werden können. Zum einen gelangen exogene Peptide über einen direkten und vermutlich vesikulären Transport in das ER und können dort ebenfalls an Klasse I Moleküle binden [10]. Zum anderen zeigte die Untersuchung der Endozytose von MHC Klasse I Molekülen, daß auf der Oberfläche von Zellen Mikrodomänen existieren, in denen MHC Klasse I Moleküle gemeinsam mit MHC Klasse II Molekülen lokalisiert sind [11]. Diese werden gemeinsam internalisiert, wie der Nachweis von Endosomen zeigte, die sowohl Klasse I als auch Klasse II Moleküle enthielten. In diesen Endosomen können beide Klassen von MHC Molekülen mit exogenen Peptiden beladen werden.

Trotz der übereinstimmenden Struktur der Klasse I Moleküle werden sie, hauptsächlich aufgrund von funktionellen Kriterien und Unterschieden in ihren Expressionsmustern, in zwei Kategorien unterteilt: die klassischen oder Klasse Ia Moleküle und die nicht-klassischen oder Klasse Ib Moleküle. Gegenüber den hochgradig polymorphen und ubiquitär exprimierten Klasse Ia Genen zeichnen sich die Klasse Ib Gene durch einen deutlich geringeren Polymorphismus und eine geringere Expressionsdichte, sowie eine zum Teil ausgeprägte Gewebespezifität ihrer Produkte aus.

Während die Klasse Ia Moleküle eine wichtige Aufgabe bei der Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen erfüllen, ist über die Funktion der Klasse Ib Moleküle wenig bekannt. Die lange kontrovers diskutierte Ansicht, die Klasse Ib Gene seien so etwas wie der Müllhaufen der MHC-Evolution, ist nach heutigem Kenntnisstand jedoch nicht mehr haltbar [12, 13]. Im Gegenteil deuten die bisher erkannten Funktionen einzelner Klasse Ib Moleküle auf zum Teil hochspezialisierte Aufgaben hin. So bindet das humane Klasse Ib Molekül HLA-E bevorzugt Peptide aus der Leadersequenz von Klasse Ia Molekülen und präsentiert diese an der Zelloberfläche [14-16]. Die Oberflächenexpression von HLA-E schützt Zellen vor einer Lyse durch NK-Zellen, die HLA-E über inhibitorische Rezeptoren der CD94/NKG2-Familie erkennen [17-20]. Die Peptidbindungsgrube, sowohl des Qa-1b Moleküls des *H-2T23*-Gens der Maus, als auch des RT.BM1 Moleküls der Ratte, besitzt große Ähnlichkeit mit der von HLA-E [21, 22]. Für das Qa-1b Molekül konnte gezeigt werden, daß es ebenso wie *HLA-E* Peptide aus den Leadersequenzen anderer Klasse I Moleküle bindet und präsentiert [23]. Für das RT.BM1 Molekül wird diese Funktion diskutiert [22].

Einem weiteren humanen Klasse Ib Molekül, HLA-G, wird vor allem aufgrund seiner spezifischen Expression auf extravillären Trophoblasten während des ersten Trimesters der Embryonalentwicklung eine wichtige Funktion beim Schutz des Embryos vor NK-Zellen der mütterlichen Decidua zugesprochen [24-28].

Eine Spezialisierung ganz anderer Art weist das H-2M3 Molekül der Maus auf. Es bindet und präsentiert *N*-formylierte Peptide, wie sie, außer in mitochondrialer, nur in prokaryontischen DNA vorkommen [29, 30].

Trotz der Erfolge der letzten Jahre, die Funktion einzelner Klasse Ib Genprodukte zu zeigen, steht für deren Mehrzahl die Aufklärung ihrer Funktion noch immer am Anfang. Hierfür sind verschiedene Gründe verantwortlich, von denen einer in der großen Anzahl unterschiedlicher Klasse Ib Genorte zu sehen ist.

Bevor näher auf die umfangreichen funktionellen Untersuchungen eingegangen wird, deren Ergebnisse klar die Bedeutung der Klasse Ib Genprodukte unter anderem für die Regulation alloreaktiver NK-Zellen belegen, soll zum besseren Verständnis ein Überblick über die Organisation der MHC Regionen in Mensch, Maus und Ratte gegeben werden.

1.1.2 MHC Klasse I Genregionen in verschiedenen Spezies

Klasse I Gene werden in allen Vertebraten bis hinab zu den Prochordaten gefunden [31, 32]. Die Anzahl und Organisation der Gene ist jedoch zwischen den Spezies sehr unterschiedlich. Im Menschen, in der Maus und in der Ratte wurden 30 bis 60 Klasse I Gene nachgewiesen. In einzelnen Spezies kann die Anzahl aber erheblich davon abweichen. Ein extremes Beispiel ist eine Gruppe afrikanischer Nagetiere (*Nannomys setulosus*), in der eine mehrhundertfache Amplifikation von drei Vorläufergenen stattgefunden hat [33]. Der genomische Aufbau der MHC-Region variiert bei den einzelnen Spezies, zeigt aber bei den Säugetieren einige allgemeine Bauprinzipien, die auch der MHC des Menschen aufweist (Abb. 1-1).

Im humanen HLA-Komplex liegt die Klasse II Region am weitesten zentromer. Neben den Genen für Klasse II Moleküle liegen hier auch solche für die Peptidtransporter TAP1 und TAP2 sowie für die Untereinheiten LMP2 und LMP7 des Proteasomenkomplexes [34-37]. Sowohl der Proteasomenkomplex als auch die Peptidtransporter besitzen wichtige Funktionen bei der Generierung und Bereitstellung von Peptidfragmenten für die Präsentation durch Klasse I Moleküle.

An die Klasse II Region schließt sich mit der Klasse III Region ein Bereich an, in dem eine Reihe unterschiedlicher Gene lokalisiert ist. Neben den Genen für die Komplementfaktoren C2 und C4 und des Faktors Bf der alternativen Komplementaktivierung liegt hier eine Gruppe von Genen für Hitzeschockproteine und auch die Zytokine TNF, $LT\alpha$ und $LT\beta$ werden hier kodiert.

Im Anschluß an die Klasse III Region beginnt ein ausgedehnter Klasse I Bereich, in dem beim Menschen Klasse Ia und Ib Gene in gemischter Folge nebeneinander vorliegen.

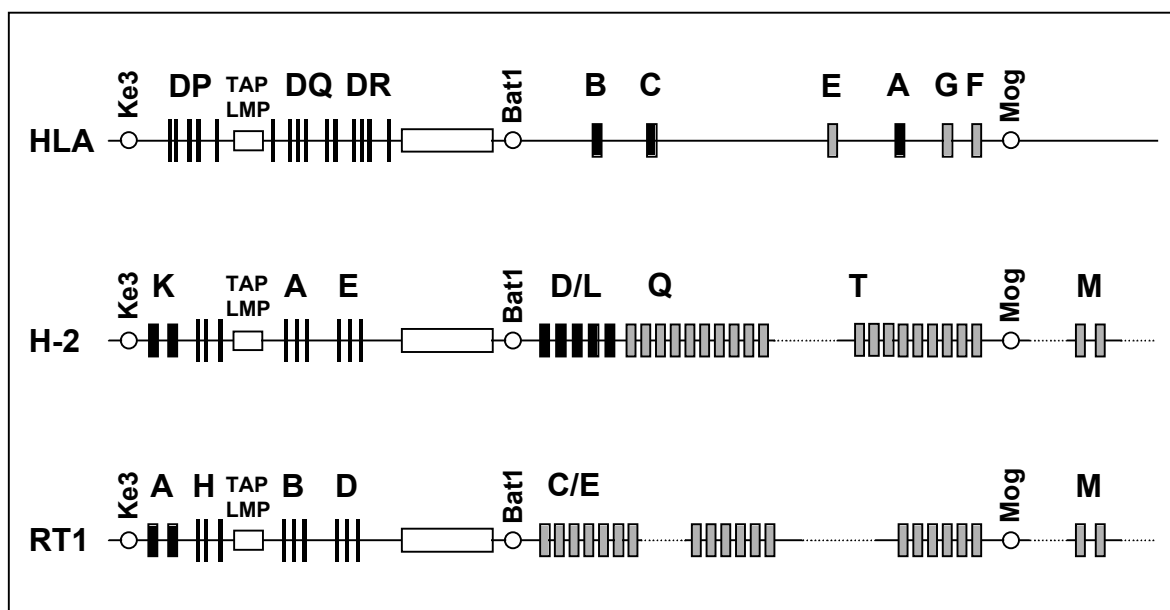


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der MHC-Organisation von Mensch (HLA), Maus (H-2) und Ratte (RT1) [38]. Die MHC Klasse Ia Gene sind als schwarze Rechtecke, die Klasse Ib Gene als graue Rechtecke abgebildet. Klasse II Gene sind durch senkrechte Balken, die Klasse III Region hingegen vereinfachend durch einen weißen Kasten dargestellt. Gestrichelte Linien zwischen Klasse I Genen deuten an, daß in diesen Regionen die Gesamtzahl der Gene zwischen den Haplotypen variiert. Die Darstellung des *H-2*-Komplexes mit fünf Genen der *D/L*-Region entspricht exemplarisch der BALB/c Maus (*H-2^d*), andere Stämme besitzen weniger *D*-Gene. Gleiches gilt für die Darstellung der *RT1.A*-Region. In der hier exemplarisch gezeigten PVG Ratte (*RT1^c*) liegen zwei Genorte vor, hingegen besitzt z.B. LEW (*RT1^l*) nur ein *RT1.A*-Gen. Die durch weiße Kreise symbolisierten, konservierten Gene *Ke3*, *Bat1* und *Mog* stellen drei Bezugspunkte für den Vergleich der MHC Komplexe dieser drei Spezies dar. Während in allen drei Spezies der Aufbau der Klasse II und Klasse III Regionen übereinstimmt, weicht die Organisation der Klasse I Gene deutlich voneinander ab. Maus und Ratte besitzen eine zweite Klasse I Region, die zentromer des Klasse II Genclusters lokalisiert ist. Hier finden sich ausschließlich Klasse Ia Gene, deren Anzahl in beiden Spezies sich jedoch zwischen einzelnen Haplotypen unterscheidet. In der Ratte konnten bisher in der telomeren Klasse I Region nur Klasse Ib Gene nachgewiesen werden.

Der Aufbau der Klasse II und Klasse III Regionen in Maus und Ratte stimmt im wesentlichen mit dem humanen MHC überein. Die Klasse Ia und Ib Gene liegen in diesen Spezies dagegen in jeweils eigenen Bereichen. Außerdem tritt in Maus und Ratte zusätzlich noch eine zweite, ausschließlich für Klasse Ia Moleküle kodierende Region zentromer der Klasse II Region auf.

Die in der zentromeren Klasse I Region der Maus liegenden Klasse Ia Gene kodieren für die stark exprimierten *H-2K*-Moleküle. Im telomeren Klasse I Bereich sind die demgegenüber schwächer exprimierten Klasse Ia Gene *H-2D* und *H-2L* lokalisiert.

In der Ratte liegen in der zentromeren Klasse I Region die ebenfalls stark exprimierten *RT1.A*-Gene, deren Anzahl in einzelnen *RT1*-Haplotypen variieren kann. So wurde in den *RT1*-Haplotypen *a*, *l*, *n* und *u* nur jeweils ein *RT1.A*-Gen nachgewiesen, im Haplotyp *RT1^c* wurden jedoch zwei Gene gefunden, die die Bezeichnung *RT1.A1^c* und *RT1.A2^c* tragen [39]. In der telomeren Klasse I Region der Ratte wurden bisher trotz intensiver Suche keine zu *H-2D* oder *H-2L* homologen Gene, sondern nur Klasse Ib Gene nachgewiesen.

Im telomeren Klasse I Bereich des MHC der Maus schließen sich an die Gene *H-2D* und *H-2L* die Klasse Ib Gene der *H-2Q*-Region an. Die *H-2Q*-Region kodiert für bis zu zehn Klasse Ib Gene: *H-2Q1* bis *H-2Q10*. Wie man aus der Klonierung der *H-2Q*-Region in den *H-2*-Haplotypen *b*, *d*, *k* und *p* weiß, variiert die Anzahl dieser Gene zwischen den einzelnen Haplotypen [40-43]. Der *b*-Haplotyp besitzt mit $9\frac{1}{2}$ Genen die Größte Anzahl, der Haplotyp *d* trägt ein fusioniertes *Q8/Q9*-Hybridgen und im *k*-Haplotyp sind die Gene *H-2Q5* und *Q9* zu einem Gen fusioniert, wodurch die dazwischen liegenden Gene *Q6*, *Q7* und *Q8* verloren gegangen sind. Die Sequenzhomologien der in Genpaaren angeordneten *Q*-Gene deuten darauf hin, daß die Gene *Q4* bis *Q9* durch Tandemduplikationen zweier Ursprungsgene entstanden sind [41, 44, 45].

Aufgrund des Befundes, daß im *f*-Haplotyp alle *Q*-Gene zu fehlen scheinen, wurde die funktionelle Bedeutung der *Q*-Region-Antigene in Frage gestellt [46]. Demgegenüber wurde jedoch klar gezeigt, daß das von den Genen *Q6* bis *Q9* kodierte, serologisch nachweisbare *Qa-2*-Antigen von alloreaktiven CTL erkannt wird [47]. Ein weiterer Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung dieses Moleküls ist seine Fähigkeit Peptide zu binden; das

Peptidspektrum scheint dabei jedoch recht eingeschränkt zu sein [48]. Möglicherweise spielen die von Qa-2 gebundenen Peptide auch eine geringere Rolle bei der Erkennung durch spezifische T-Zellrezeptoren als bei anderen Klasse I Molekülen [49].

Die nächsten Klasse I Gene im MHC der Maus liegen in der *H-2T*- und der *H-2M*-Region. Die *T*-Region scheint diejenige Klasse I-Region mit den größten Variabilitäten zwischen den Haplotypen zu sein. Sie kodiert auch für die größte Anzahl von Genen. Insgesamt sind 25 Klasse I Gene der *T*-Region bekannt. Je nach Haplotyp werden hiervon bis zu 18 verschiedene Klasse I Gene nachgewiesen. Sie unterscheiden sich untereinander stärker als die Klasse I Gene der anderen Regionen. Charakteristische Unterschiede finden sich vor allem in den 3'-Bereichen der Gene. Auch für diese Region wurde eine Tandemduplikation der Gene gefunden [50, 51]. Exprimiert werden die Gene nur auf Thymozyten und Leukämiezellen sowie im Darm. Für die T1a-Antigene konnte gezeigt werden, daß sie γ/δ -T-Zellen antigene Peptide präsentieren [52, 53].

Neben dem Qa-1b-Genprodukt des *H-2T23*-Gens, das strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zum humanen HLA-E aufweist, wurde unlängst ein neues Gen, *H-2T25*, beschrieben, das aufgrund seiner Expression in der Blastozyste und der Plazenta als das zum humanen *HLA-G* analoge Gen der Maus diskutiert wird [54].

Das telomere Ende des *H-2*-Komplexes wird von der *M*-Region gebildet. Diese Region ist unter den verschiedenen Haplotypen recht gut konserviert. Im Haplotyp *bc* konnten 18 *H-2M* Gene nachgewiesen werden [55, 56]. Die Gene der *M*-Region werden in zwei Familien unterteilt. Daneben existieren weitere *M*-Gene, die keiner dieser Familien angehören.

Für das exprimierte Produkt des *H-2M3*-Gens, das *N*-formylierte Peptide bindet und präsentiert, wurde klar gezeigt, daß es bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien die Antigenpräsentation für CTL übernimmt [29, 30, 57, 58]. Darüber hinaus wurde beschrieben, daß *M3 in vitro* auch nicht formylierte Peptide viraler Herkunft binden und für die Erkennung durch CTL präsentieren kann [59].

Im MHC der Ratte liegt ebenso wie im Menschen und in der Maus telomer der Klasse II und Klasse III Regionen ein ausgedehnter Klasse I Bereich. Er kodiert für eine große Anzahl von Klasse Ib Genen. Für den Haplotyp *av1* wurden durch die Analyse von 115 Cosmidklonen aus diesem Abschnitt insgesamt 61 verschiedene Klasse Ib Gene nachgewiesen [60]. Dieser große Klasse Ib Bereich unterteilt sich in die direkt auf die Klasse III Region folgende

RTI.C/E-Region und die weiter telomer gelegene *RTI.M*-Region. Die Grenze zwischen *C/E* und *M* wird durch den rekombinanten Haplotyp *r38* markiert, der die *M*-Region von allen anderen serologisch definierten Klasse I Regionen trennt [61]. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die *M*-Region ein Ende des *RTI*-Komplexes bildet, was eine deutliche Übereinstimmung mit der *H-2M*-Region der Maus darstellt. Darüber hinaus sind aus der *M*-Region der Ratte mit den Klasse Ib Genen *RTI.M3*, *M4* und *M5* drei Orthologe zur Maus bekannt, was zusätzlich für eine Konservierung dieses Bereiches zwischen beiden Spezies spricht [62-64].

Der direkte Vergleich von *RTI.C/E* und der *H-2Q*- und *H-2T*-Region der Maus gestaltet sich schwieriger, da hier nur für wenige Gene eine orthologe Beziehung zwischen den Spezies gezeigt werden konnte. In unmittelbarer Nachbarschaft innerhalb der *RTI.C/E*-Region liegen die Gene *RTI.N*, *RTI.O* und *RTI.S* [65-69]. Einige dieser Gene weisen stärkere Homologien zu bekannten Maus Klasse I Genen der *H-2T*-Region auf, als zu anderen Klasse I Genen der Ratte. So ist *RTI.N* homolog zu *H-2T10* und *H-2T22* der Maus, und *RT.BM1* wird als orthologes Gen zu *H-2T23* beschrieben [22, 70]. Die Gene *RTI.N* und *RTI.O* liegen nebeneinander in mehreren Kopien vor und wurden vermutlich als Paar mehrfach dupliziert [65].

Eine Gruppe von Genen, die das Wachstum und die Fertilität beeinflussen, wurden durch Kreuzungsexperimente in den MHC kartiert [71]. Die *grc*-Mutation (von engl. Growth and Reproduction Complex, *grc*) im Rattenstamm BIL/1 ist mit einer genomischen Deletion von etwa 70 kb verbunden, die auch die Gene *RTI.N* und *RTI.O* betrifft [72]. Die *grc*-Mutation führt bei den betroffenen Tieren zu eingeschränktem Wachstum, verminderter Fruchtbarkeit und größerer Empfindlichkeit gegenüber chemischen Karzinogenen wie Diethylnitrosamin [71, 73]. Die hierfür verantwortlichen Gene sind jedoch noch nicht identifiziert, und es ist noch unklar, ob der Verlust der Klasse Ib Gene zur der Ausbildung des mutanten Phänotyps beiträgt.

Darüber hinaus wurde in der *RTI.C/E*-Region eine Reihe weiterer Klasse Ib Gene gezeigt. Die Gene *RTI.L* und *RTI.R* wurden bei der serologischen Untersuchung von zwei mutanten Haplotypen nachgewiesen, die Deletionen innerhalb der *RTI.C/E*-Region aufweisen [74]. Der erste mutante Stamm, LEW.1LM1 mit dem Haplotyp *RTI^{lm1}*, ist aus der F2-Generation einer LEW.1W × LEW Zucht hervorgegangen. Lymphozyten dieses Haplotyps reagierten weder mit *C^d*-spezifischen noch mit *C^u*-spezifischen Antiseren. Demnach hatte *lm1* einerseits durch seine

genomischen Deletion exprimierte Klasse I Gene von LEW (RTI^l) verloren und andererseits keine von LEW.1W (RTI^u) hinzu bekommen. Die RFLP-Analyse der Mutante mit einer Klasse I Sonde machte deutlich, daß in *lm1* etwa 100 kb der Klasse I positiven Fragmente fehlen [75]. Trotz des Verlustes an exprimierten Klasse I Genen in *lm1* wurde in Transplantationsexperimenten Haut von LEW.1LM1-Spendern von Empfängertieren des *lv3*-Haplotyps abgestoßen [74]. Das bei diesen Experimenten erhaltene *lv3*-anti-*lm1*-Antiserum wies in einer Reihe von Haplotypen ein gering polymorphes und schwach exprimiertes Antigen nach, das die Bezeichnung *RTI.L* erhielt.

Die Entdeckung eines weiteren exprimierten Gens der gleichen Region folgte aus der Untersuchung des mutanten *lm2*-Haplotyps von LEW.1LM2 [76]. Dieser Stamm ging aus der F2-Generation einer LEW.1LV3 × LEW Kreuzung hervor und hat aufgrund eines ungleichen Crossing-overs innerhalb der *RTI.C/E*-Region wenigstens ein exprimiertes Klasse I Gen verloren. Den Hinweis auf das Fehlen dieses Gens gaben Transplantationsexperimente zwischen der *lm2*-Mutante und der serologisch nicht von *lm2* unterscheidbaren *r15*-Rekombinante, die aus einer Kreuzung zwischen *l* und *u* hervorgegangen war [74]. Während LEW.1R15 Empfängertiere Haut von LEW.1LM2 Spendern unbegrenzt akzeptierten, kam es im umgekehrten Fall zu einer akuten Abstoßung. Außerdem reagierten Lymphknotenzellen von LEW.1LM2 Tieren, die LEW.1R15 Hauttransplantate abgestoßen hatten, auf eine *in vitro* Restimulation durch *r15* mit einer heftigen zytotoxischen Antwort. Die hieraus resultierenden CTL lysierten nicht nur *r15*-Zielzellen, sondern auch solche der Haplotypen *lv3*, *u*, *l* und *lm1*. Dies zeigte, daß alle diese Haplotypen das in *lm2* fehlende Gen exprimierten. Dieses Gen trägt den Namen *RTI.R* [77].

Die Analyse von Klasse I positiven cDNA-Klonen des *l*-Haplotyps führte zu der Beschreibung von zwei weiteren Genen: dem *11/3R*-Gen und dem *LW2*-Gen [78, 79]. Beide fehlen in der Deletionsmutante *lm1*, wie durch PCR-Analysen mit genspezifischen Primern gezeigt wurde. Die molekulargenetische Charakterisierung von *11/3R* weist es eindeutig als Klasse Ib Gen aus [78]. Es besitzt aber einige Besonderheiten, wie z.B. einen im Vergleich zu anderen Klasse I Genen ungewöhnlich langen 3' untranslatierten Bereich. Mit cDNA-Sonden aus diesem Bereich wurde in genomischer DNA verschiedener Haplotypen eine Reihe von kreuzhybridisierenden Fragmenten nachgewiesen, von denen einige in dem mutanten *lm1*-Haplotyp fehlten. Es wurde daher postuliert, daß *11/3R* Vertreter einer etwa 12 Mitglieder umfassenden Genfamilie innerhalb der *RTI.C/E*-Region ist [78]. Es blieb jedoch noch zu

klären, ob alle mit den *I1/3R*-Sonden nachgewiesenen Fragmente auch Klasse I Gene repräsentieren.

Das *LW2*-Gen ist sehr wahrscheinlich identisch mit dem durch monoklonale Antikörper (mAK) nachgewiesenen *RTI.C^d* [80]. Die serologische Untersuchung einer Reihe von *RTI*-Haplotypen mit diesen mAK beschreibt für dieses Molekül eine sehr enge Stammverteilung und deutet für das *RTI.C^d*-Gen einen hohen Grad an Polymorphismus an. Darin ist es trotz seiner Lokalisation in der *RTI.C/E*-Region den Klasse Ia Genen ähnlich. Auf der anderen Seite wurde für *RTI.C^d* eine gegenüber dem Klasse Ia Gen *RTI.A^l* deutlich verminderte Expression gezeigt, die typisch für Klasse Ib Gene ist. Der Vergleich der Promotorsequenzen zwischen *RTI.A^l* und *RTI.C^d* zeigte allerdings keine Unterschiede auf, die diese verminderte Expression erklärten [81]. Es wurden im Gegenteil weitere Gemeinsamkeiten zwischen *RTI.C^d* und *RTI.A^l* festgestellt. So fehlt z.B. beiden Genen ein identisches 11 bp Motiv im Enhancer A, was zu dem Verlust einer NFκB Bindungsstelle führt. Aus den fehlenden Unterschieden beider Promotorregionen wurde gefolgert, daß die geringe Oberflächenexpression von *RTI.C^d* auf posttranslationale Faktoren, etwa Unterschiede bei der β_2 M-Bindung oder bei der Verfügbarkeit des passenden Peptids im endoplasmatischen Retikulum, zurückzuführen sei.

Vor kurzem wurden weitere exprimierte Klasse Ib Genen beschrieben, die sich aufgrund von Sequenzvergleichen deutlich von den bisher bekannten Klasse Ib Genen unterscheiden und daher in der Gruppe der *RTI-U*-Gene zusammengefaßt wurden [82]. Sie stehen den Klasse Ia Genen näher als andere Klasse Ib Gene und werden von polyklonalen CTL als Zielstruktur erkannt, wie durch die Transfektion von Maus L-Zellen mit cDNA-Klonen dieser Gene gezeigt werden konnte.

Die Klasse Ib Gene der *RTI.C/E*-Region stellen nach den bisherigen Erkenntnissen eine heterogene Gruppe von Genen dar, die wegen der geringen Zahl an orthologen Beziehungen nur schwer direkt mit den Klasse Ib Genen der *H-2Q*- und *H-2T*-Region verglichen werden können. Eine vergleichende Analyse wird jedoch durch die Einbeziehung von Nicht-Klasse I Genen der telomeren Klasse I Region ermöglicht, die sowohl in ihren Sequenzen als auch in ihrer Position relativ zueinander über Speziesgrenzen hinweg stark konserviert sind. In Abbildung 1-1 sind mit *Ke3*, *Bat1* und *Mog* bereits einige Markergene des MHC von Mensch, Maus und Ratte gezeigt. In der telomeren Klasse I Region von Mensch und Maus wurden

zusätzliche Marker beschrieben, die über ein konserviertes Bezugssystem (*framework*) den Vergleich zwischen beiden Spezies ermöglichten. In der diesem Vergleich zugrundeliegenden Framework-Hypothese wird postuliert, daß innerhalb eines stark konservierten Gerüsts aus Nicht-Klasse I Genen an definierten Positionen bestimmte Bereiche existieren, in denen die Klasse I Gene liegen [83]. Der innere Aufbau der Klasse I Bereiche variiert deutlich zwischen den Spezies, nicht aber ihre Position relativ zu dem Gerüst aus Nicht-Klasse I Markern. Zu diesen Markern der telomeren Klasse I Region zählen die Gene *Bat1*, *Pou5f1*, *Tcf19*, *S* und *Gna-rs1*, für die eine Lokalisation innerhalb der *RTI.C/E*-Region bereits gezeigt wurde [84].

1.1.3 Funktionelle Bedeutung der Klasse Ib Gene in *RTI.C/E*

Die bisher vorgestellten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen belegen klar die Erkennung von Klasse Ib Molekülen der *RTI.C/E*-Region durch alloreaktive zytotoxische T-Zellen und ihre Rolle bei der Transplantatabstoßung im allogenen Tiermodell. Wie sich an den Beispielen der humanen Klasse Ib Moleküle HLA-E und HLA-G gezeigt hat, kommt einigen Klasse Ib Molekülen darüber hinaus eine wichtige physiologische Funktion bei der Regulation der NK-Zellreaktivität zu.

Das derzeitige Verständnis der NK-Zellfunktion wird durch das „missing-self“-Modell beschrieben [85]. Während zytotoxische T-Zellen ihre Aufgabe darin haben, jedes an Klasse I Moleküle gebundene fremde Peptid zu erkennen, wird angenommen, daß die Funktion von NK-Zellen darin besteht, körpereigene Klasse I Moleküle zu erkennen. Solange eine NK-Zelle auf Zielzellen eine ausreichende Menge an körpereigenen Klasse I Molekülen findet, wird sie in ihrer lytischen Funktion inhibiert. Eine Zelle kann sich durch verminderte Expression von Klasse I Molekülen oder durch die Expression veränderter Klasse I Moleküle einer Erkennung durch CTL entziehen, durch die fehlende Expression von körpereigenen Klasse I Molekülen ist sie allerdings nicht mehr fähig, NK-Zellen zu inhibieren und wird daher durch diese lysiert. Der gleiche Effekt, der zu einem Schutz vor CTL führt, bewirkt eine größere Suszeptibilität gegenüber NK-Zellen. Die molekulare Basis dieser Vorstellung bildet die Vielzahl inzwischen beschriebener inhibitorischer NK-Rezeptoren unterschiedlicher Familien [86-89].

Neben den inhibitorischen Rezeptoren wurden jedoch auch aktivierende NK-Rezeptoren nachgewiesen, was dem „missing-self“-Modell zunächst zu widersprechen schien [90]. NK-Zellen exprimieren aber im Gegensatz zu T-Zellen in der Regel mehr als einen Rezeptortyp

und alle NK-Zellen, die einen aktivierenden Rezeptor besitzen, exprimieren daneben einen inhibitorischen Rezeptor oft anderer Spezifität [90]. Es wird angenommen, daß das inhibitorische Signal das aktivierende dominiert und eine Zielzelle daher vor einer Lyse durch NK-Zellen geschützt ist, solange sie die körpereigenen Klasse I Moleküle exprimiert, die von dem in einem Individuum vorhandenen Repertoire an inhibitorischen NK-Rezeptoren erkannt werden.

Viele der bisherigen Erkenntnisse über spezifische Klasse I-Erkennung durch NK-Zellen beruhen auf *in vitro* Experimenten mit Klasse I-transfizierten Zielzellen, die häufig selbst schon vor der Transfektion für eine Lyse durch NK-Zellen empfänglich sind. Diese Testsysteme eignen sich gut, um die Eignung von Klasse I Genen zu untersuchen, transfizierte Zellen vor einer Lyse durch NK-Zellen zu schützen. Sie sind jedoch weniger geeignet, das komplexe Zusammenwirken von gleichzeitig auf den NK-Zellen vorhandenen inhibitorischen und aktivierenden Klasse I Rezeptoren zu untersuchen. In diesem Punkt bietet das Rattenmodell mit seiner Vielzahl an MHC-kongeneten rekombinanten und mutanten Inzuchtstämmen den Vorteil, einzelne Unterschiede in definierten MHC Bereichen zwischen NK- und Zielzelle systematisch untersuchen zu können.

Die bisher an der Ratte erfolgten Untersuchungen belegten, daß die Empfindlichkeit gegenüber der Lyse durch NK-Zellen in verschiedenen Haplotypkombinationen von Genen der *RTI.C/E*-Region bestimmt wird [91]. Dabei zeigte sich unter anderem, daß Zielzellen des mutanten Haplotyps *RTI^{lm1}* weniger empfänglich gegenüber der Lyse durch alloreaktive NK-Zellen waren, als Zielzellen seines Parentalhaplotyps *RTI^l*. Dies deutete auf einen Verlust von NK-Zell aktivierenden MHC-Genen im *lm1*-Haplotyp hin.

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, daß Zielzellen von LEW.1LM1 gegenüber der Lyse durch NK-Zellen aus PVG.1L, die den unveränderten *RTI^l*-Haplotyp trugen, empfindlicher waren als Zielzellen aus LEW [92]. Und die Transfektion von P815-Zellen mit *RTI.C^l* führte zu einem Schutz vor der Lyse durch NK-Zellen, die *RTI.C^l* selbst als eigenes Antigen exprimieren [93].

1.2 Fragestellung dieser Arbeit

Die telomere Klasse I Region des MHC der Ratte enthält etwa 60 Klasse I Gene, von denen einige bereits funktionell und molekulargenetisch gut charakterisiert sind. Die genaue genomische Organisation dieser *RT1.C/E*-Region ist jedoch noch nicht geklärt.

Insbesondere die Zuordnung der Klasse Ib Gene zu unterschiedlichen Familien und die physikalische Kartierung der Region erfolgten bislang nur unvollständig. Beides ist jedoch eine unerläßliche Voraussetzungen für den Vergleich der MHC Regionen unterschiedlicher Spezies unter evolutionsbiologischen Gesichtspunkten und vor allem für die weitere Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Vielzahl von Klasse Ib Genprodukten.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die weitere Charakterisierung der *RT1.C/E*-Region am Beispiel des *I*-Haplotyps der Lewis Ratte, für den eine Reihe von kongenen Stämmen mit rekombinanten und mutanten Haplotypen existiert, durch die eine immungenetische und funktionelle Charakterisierung einzelner Klasse I Moleküle ermöglicht und zudem die molekulargenetische Untersuchung erleichtert wird.

Einen besonderen Schwerpunkt bildet dabei die Untersuchung zweier mutanter Rattenstämme, LEW.1LM1 (*lm1*) und BN.1LM3 (*lm3*), die unterschiedliche genomische Deletionen innerhalb des gleichen Bereiches der *RT1.C/E*-Region aufweisen.

Die Aufgaben im einzelnen:

1. Physikalische Kartierung der genomischen Deletionen der mutanten *RT1*-Haplotypen *lm1* und *lm3*.
2. Charakterisierung der Klasse Ib Gene der *I1/3R*-Familie.
3. Molekulargenetische Charakterisierung des neu entdeckten mutanten Stammes LEW.1UM1.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Tabelle 2-1: Verwendete Inzuchtstämme

Stamm	RT1-Haplotyp	RT1-Regionen A B/D C	Herkunft der Versuchstiere [•]
<u>Standard Inzuchtstämme</u>			
AVN	a	a a a	Kuv
BUF	b	b b b	Ztm
PVG	c	c c c	Iap/Ola
BDV	d	d d d	Ztm
BN	n	n n n	Ztm
<u>Variante Haplotypen</u>			
DA	av1	a a av1	Ztm, Ztm
BDIX	dv1	d d dv1	Ztm
F344	lv1	1 1 lv1	Ztm
BS	lv2	1 1 lv2	Ztm
BH	lv3	1 1 lv3	Ztm
SPRD-Cu	lv	1 1 lv	Ztm
LE	uv2	u u uv2	Ztm
OM	uv3	u u uv3	Ztm
BB.Mol	uv4	u u uv4	Mol
<u>RT1 kongene Stämme</u>			
<u>LEW-Familie</u>			
LEW	l	1 1 1	Won
LEW.1A (AVN)	a	a a a	Ztm
LEW.1C (WIST)	c	c c c	Ztm
LEW.1N (BN)	n	n n n	Won
LEW.1LV3 (BH)	lv3	1 1 lv3	Won
LEW.1R14	r14	u u l	Won
LEW.1R15	r15	1 1 u	Won
LEW.1UM1	um1	u u um1	Won
<u>BN-Familie</u>			
BN.1LM3	lm3	1 1 lm3	Ztm
BN.1R37	r37	b b n	Ztm, Pit

[•] Die Züchtersymbole stehen für:

Iap	Institute of Animal Physiology, Cambridge, Drs. G. Butcher & J. C. Howard
Kuv	Universität Kiel, Dr. H. U. Wottge
Mol	Mollegaard Breeding Center Ltd., Mollegaard
Ola	Harlan Olac Ltd., Bicester
Pit	University of Pittsburgh, Drs. H. W. Kunz and T. J. Gill III
Won	Transplantationslabor, Medizinische Hochschule Hannover, Dr. K. Wonigeit
Ztm	Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover

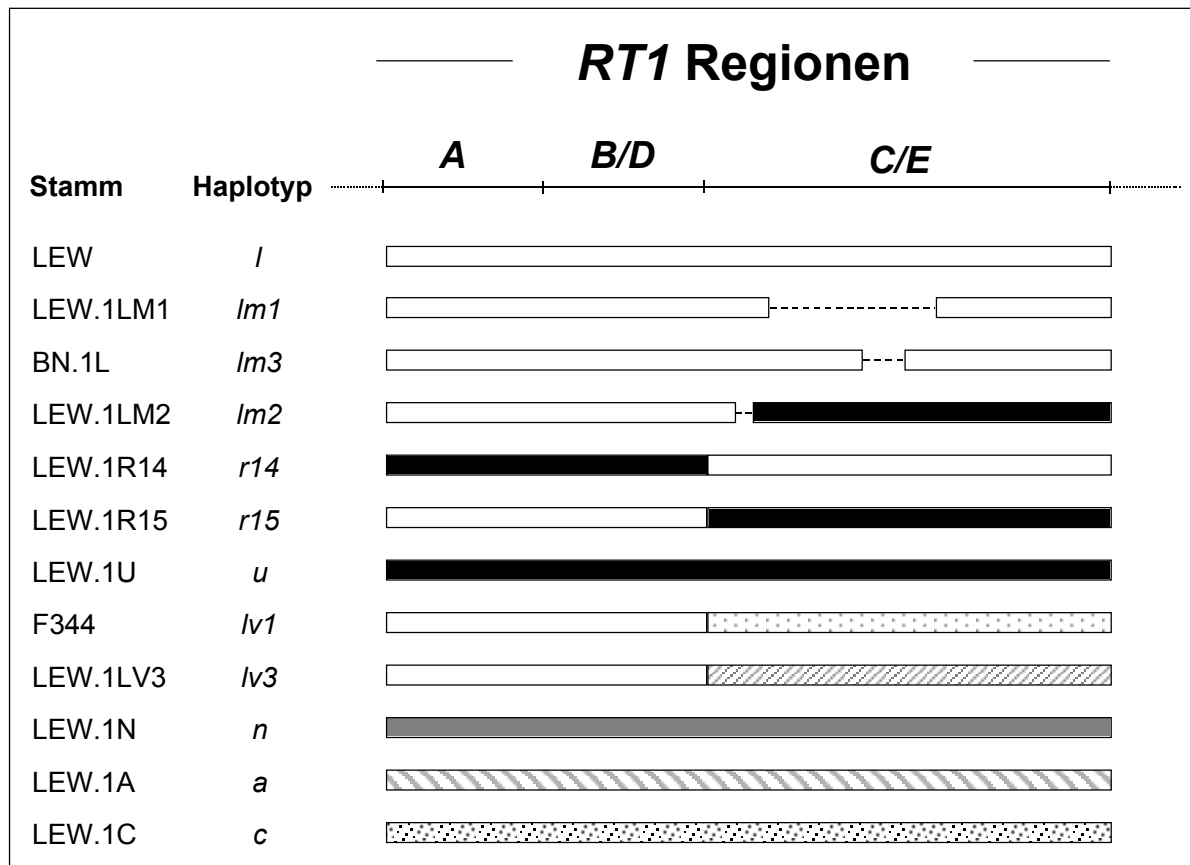


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung verschiedener in dieser Arbeit untersuchter RTI-Haplotypen. Unterschiedliche Haplotypen sind durch verschiedene Graustufen kodiert. Gestrichelte Linien zeigen deletierte Bereiche an.

2.1.2 Bakterienstämme

HB101	[94]
E. coli 1400	[95]
INV α F'	Invitrogen, San Diego

2.1.3 Vektoren

pcos5EMBL	[96]
pCR2.1	Invitrogen, San Diego
pUC18	[97]

2.1.4 PCR-Primer

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz	Bindungsstelle
NC2/490U	5' -ctacagctcaccttggaaacg-3'	(nt 1723-1742)
NC2/490D	5' -taactccagaacaccagacg-3'	(nt 2190-2209)
NC2/850U	5' -ctgcactgccctgtgttctcttcc-3'	(nt 1229-1252)
NC2/850D	5' -accacaccagaccctcagaaccct-3'	(nt 2056-2079)
Δ44U	5' -catgctgctg-3'	(nt 2009-2018)
Δ44D	5' -gaaagacacc-3'	(nt 2044-2053)
Primer und Hybridisierungssonden von Rothermel et al.:		
Primer 1		(nt 939- 960)
Primer 2		(nt 1139-1161)
Sonde 11/3-2		(nt 1769-2060)
Sonde 5/1		(nt 2061-2174)

2.1.5 Sonden

pWW6.3	Ratte Klasse I-cDNA, enthält Leadersequenz, Exon 1 und 2 sowie 90% von Exon 3 [98]
Bat1	genomischer Maus Bat1-Klon, 2,5 kb XbaI Fragment [99]
TNF α	genomischer Maus TNF-Klon, ca. 900 bp NarI/EcoRI Insert aus dem TNF α -Gen [100]
Oct3	Sonde für das Pou5F1-Gen [101]
Sc1	PCR-Sonde für das Tcf19-Gen [102]
MS	cDNA-Sonde für das humane S-Gen [103]
MMRI	cDNA-Sonde für das Maus Gna-rs1-Gen [104]
3'pMK	genomische Ratten Klasse I-Sonde, 3' untranslatierte Region aus RT1.N, 190 bp BglII/SpeI-Fragment [70]
Δ44	synthetisches Oligonukleotid, 44 bp-Motiv aus der 3' untranslatierten Region des Rattengens 11/3R (nt 2009-2053)
NC2/490	PCR-amplifiziertes 490 bp Fragment aus der 3' untranslatierten Region des Rattengens 11/3R (nt 1723-2209)
11/3-2	cDNA Sonde aus der 3' untranslatierten Region des MHC Klasse Ib Gens 11/3R (nt 1769-2060) [78]

2.1.6 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer für Gelelektrophoresen

0,25	%	Bromphenolblau
0,25	%	Xylencyanol
25	%	Ficoll 400
50	mM	EDTA pH 8.0

CIP-Puffer (10× Stammlösung)

0,5	M	Tris·HCl pH 9.0
10	mM	MgCl ₂
1	mM	ZnCl ₂
10	mM	Spermidin

Denaturierungslösung (Sequenzierung doppelsträngiger DNA)

2	N	NaOH
2	mM	EDTA

50× Denhardts Lösung

1	%	Ficoll 400
1	%	Polyvinylpyrrolidon
1	%	Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)

ES-Lösung (DNA-Isolation)

500	mM	EDTA pH 8.0
5	%	N-Lauroylsarcosin
0,01	%	Proteinase K

Hybridisierungslösung (RFLP-Analysen)

6×		SSC
5×		Denhardts
0,5	%	SDS
10	%	Dextransulfat
10	µg/ml	fragmentierte, denaturierte Lachssperma-DNA

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium zur Bakterienkultivierung; pro Liter)

10	g	NaCl
10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt

Lösungen für Hybridisierungen im Agarosegel

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH
0,15 M NaCl

Neutralisationslösung

0,5 M Tris·HCl pH 8.0
0,15 M NaCl

Hybridisierungspuffer

50 % Formamid, deionisiert
2× SSC pH 7.0
1 % Sarcosyl
4 mM EDTA pH 8.0
0,12 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.8
4× Denhardt

Waschlösung zum Entfernen alter Sonden

5 mM EDTA pH 8.0

PBS pH 7.4

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,24 g KH₂PO₄
ad 1000 ml ddH₂O

Lösungen für Plasmidpräparationen

Lösung I

50 mM Glukose
25 mM Tris·HCl pH 8.0
10 mM EDTA pH 8.0

Lösung II

0,2 N NaOH
1 % SDS

Lösung III

3 M Natriumazetat
pH 4.8 mit Eisessig einstellen

Proteinase K-Puffer

0,5 M EDTA pH 8.0
1 % N-Lauroylsarcosin

RNase, DNase-frei

10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 15 mM NaCl lösen und 15 Minuten auf 95°C erhitzen, nach langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur bei -20°C lagern

Lösungen für Southern Transfer

Denaturierungslösung

125 mM HCl

Neutralisationslösung

3 M Natriumazetat pH 5.5

20× SSC pH 7.0

175,3 g NaCl
88,2 g Na-Citrat
ad 1000 ml ddH₂O

TAE-Puffer (50× Stammlösung)

242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
ad 1000 ml ddH₂O

TBE-Puffer (10× Stammlösung)

108 g Tris
55 g Natriumborat
40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
ad 1000 ml ddH₂O

TE-Puffer pH 8.0

10 mM Tris-HCl pH 8.0
1 mM EDTA pH 8.0

2.1.7 Enzyme, Kits und Chemikalien

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer Mannheim
DNase	Boehringer Mannheim
Lysozym	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim, GibcoBRL, u.a.
Taq-DNA-Polymerase	Stratagene, Quiagen, Sigma
T4 DNA-Ligase	Stratagene
T4-Polynukleotidkinase	Stratagene

GeneClean Kit	Dianova
Nick-Translationskit	Boehringer Mannheim
Nucleobond DNA-Isolierungskit	Macherey-Nagel
Random-Primed-Labelingkit	Boehringer Mannheim
Sequenase 2.0 Sequenzierungskit	USB
TA-Cloning Kit	Invitrogen
Agarose NA	Pharmacia
Agarose, low melting	USB
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco
Bacto Tryptone	Difco
Bromphenolblau	Fluka
Dextransulfat	Pharmacia
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNA-Längenmarker	Gibco, NEB
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA Na ₂)	Merck
Ficoll	Pharmacia
Formamid	Riedel de Haen
Gel Slick	Serva
Hefe-Extrakt	Difco
Kanamycin	Sigma
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Serva
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Serva
Sephadex G50	Pharmacia
X-Gal	Serva
Xylencyanol	Fluka

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Baker, Merck, Serva oder Sigma bezogen (Reinheitsgrad p.A.).

[α- ³² P]-dATP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml)	Amersham Buchler, NEN
[α- ³² P]-dCTP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml)	Amersham Buchler, NEN
[γ- ³² P]-ATP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml)	Amersham Buchler, NEN
[α- ³⁵ S]-dATP	Amersham Buchler, NEN

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten	BioRad
Filterpapier GB003 580×600 mm	Schleicher & Schuell
Glaswatte, silanisiert	Serva
Mikrotiterplatten F96	Nunc
Nitrocellulosemembran BA85 200×200 mm	Schleicher & Schuell
Nitrocelluloserundfilter BA85 Ø 85 mm	Schleicher & Schuell
Nylonmembran Hybond N ⁺	Amersham
0.2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
0.5ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
1.5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme 18×24 cm	Amersham
Röntgenfilme 30×40 cm	Amersham
Zentrifugenröhrchen 2095 (15 ml)	Falcon
Zentrifugenröhrchen 2070 (50 ml)	Falcon

2.1.9 Geräte

Elektrophoresekammern	
Horizon 11×14 cm (24 cm Elektrodenabstand)	BRL
Horizon 20×25 cm (35 cm Elektrodenabstand)	BRL
H1, H2, H3 und H4	BRL
Geltrockner Modell 583	Biorad
Handmonitor f. ionisierende Strahlung	Berthold
Hybridisierungsinubator Typ 7601	GFL
Inkubationshaube Ceromat H	Braun
KB-Kamera AE-1 Programm	Canon
Kugelmühle Typ MM2	Retsch
Kühlfalle KF	Bachofer
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Membranpumpe	ABM
Mikrowelle	Sharp
PCR-Geräte	
GeneAmp 9600	Perkin-Elmer
Minicycler	MJ Research
Röntgenkassetten 18×24 cm und 30×40 cm	Fa. Bode
Rotaphor PFGE-Kammer	Biometra
Rotationsmischer 3300	Eppendorf
Rotationsmischer Reax 2000	Heidolph
Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL
Sequenziergelkammer Typ S2	BRL
Sofortbildkamera MP4	Polaroid
Spannungsversorgung EPS 500/400	Pharmacia
Spannungsversorgung EPS 3000/150	Pharmacia

Spektralphotometer Ultospec II	Pharmacia
Sterilbank Lamin-Air HLB2472GS	Heraeus
Thermostat 5320	Eppendorf
Tisch-Universalschüttler	Braun
UV-Transilluminator (302 nm)	Bachofer
Vakuumofen VTR 5022	Heraeus
Verstärkerfolien 18×24 cm und 30×40 cm	DuPont
Videodokumentation Biodoc II	Biometra
Wasserbad Typ 1001	GFL
Zentrifugen	
Biofuge 15, Cryofuge 6-4S, Minifuge GL, Varifuge 3,2RS	Heraeus
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse von Restriktionslängenpolymorphismen im MHC der Ratte

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Lebergewebe

Für die Isolierung genomischer DNA wurden direkt nach der Entnahme zerkleinerte und sofort tiefgefrorene Rattenlebern in einer Kugelmühle aus Edelstahl unter Stickstoffkühlung pulverisiert. In die Präparationen wurde in der Regel die einer halben Rattenleber entsprechende Menge eingesetzt, der Rest wurde bei -80°C gelagert.

2.2.1.1.1 Präparation hochmolekularer DNA für RFLP-Analysen

Das einer halben Rattenleber entsprechende, noch tiefgefrorene Pulver wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 30 ml ES-Lösung überführt und nach Zugabe von 1% (v/v) β -Mercaptoethanol zum Zellaufschluß für 3 Stunden bei 50°C geschüttelt. Proteine und Zelltrümmer wurden durch zwei Phenolextraktionen entfernt. Hierzu wurde das Gemisch mit einem Volumen TRIS-gepuffertem Phenol und einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 5 Minuten behutsam geschwenkt und zur Phasentrennung für 10 Minuten bei $16.000 \times g$ zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde jeweils vorsichtig abgenommen und erneut extrahiert. Zur Entfernung von Phenolresten erfolgte eine Extraktion mit zwei Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Anschließend wurde die wässrige Phase über Nacht bei 4°C gegen das fünfzigfache Volumen 50 mM TRIS-HCl/10 mM NaCl pH 8.0 dialysiert. Nach Zugabe von $10\mu\text{g}$ DNase-freier RNase je ml Dialysat wurde in einer dreistündigen Inkubation bei 37°C vorhandene RNA abgebaut. Die Lösung wurde erneut zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase anschließend mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 7.0 versetzt und vorsichtig mit dem zweifachen Volumen eiskaltem Ethanol überschichtet. Beim Schwenken der Lösung fiel die chromosomale DNA an der Phasengrenze in langen Fäden aus. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C wurde die DNA bei $21.000 \times g$ zentrifugiert und anschließend getrocknet. Zur möglichst schonenden Lösung der DNA wurde diese mit einem der erwarteten Ausbeute entsprechenden Volumen von sterilem TE-Puffer pH8.0 überschichtet und mehrere Tage bei 4°C gelöst. Die Bestimmung der Konzentration sowie die Reinheitskontrolle der Präparation erfolgte photometrisch.

2.2.1.1.2 DNA-Präparation in Agarose für Puls-Feld-Gelelektrophorese

Bei der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) können DNA-Fragmente von bis zu 10 Mb Länge aufgetrennt werden. Die zu untersuchende DNA muß dafür eine besonders hohe Qualität aufweisen und möglichst ungeschert sein. Um die während der Präparation und der nachfolgenden Schritte auf die DNA wirkenden Scherkräfte zu minimieren, wird das Ausgangsmaterial noch vor dem Aufschluß der Zellen in Agarose eingebettet und diese in kleine Blöckchen gegossen. Erst nach dem Erstarren der Blöckchen erfolgt die eigentliche DNA-Präparation.

Das etwa einer halben Leber entsprechende, tiefgefrorene Pulver wurde in 50 ml eiskaltem PBS aufgenommen und auf Eis behutsam resuspendiert. Zur Abtrennung von Geweberesten und groben Zellklumpen wurde die Suspension durch mehrere Lagen sterilen Verbandmulls filtriert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 200 × g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Diese Suspension wurde mit dem gleichen Volumen einer auf 42°C temperierten 1%igen low-melting-point Agarose-Lösung vermischt und unverzüglich in vorgekühlte Blöckchenformer pipettiert. Nach dem Erstarren wurden die Blöckchen in einfachkonzentrierten Proteinase K-Puffer mit 1 mg/ml Proteinase K überführt und zum Zellaufschluß über Nacht oder länger bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Blöckchen zweimal mit je 10 ml TE-Puffer pH 8.0 bei Raumtemperatur gespült und ihnen dann zur Deaktivierung der Proteinase K der Serin-Proteaseinhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in einer Endkonzentration von 40 µg/ml in TE-Puffer pH 8.0 zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 50°C wurde die Inhibitorlösung durch frische ersetzt und die Inkubation wenigstens über Nacht bei 50°C fortgesetzt. Zum Abschluß wurden die Blöckchen dreimal für je 30 Minuten bei 50°C und mehrmals bei 4°C mit je 10 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in der gleichen Lösung gelagert. Die Bestimmung der Konzentration sowie die Reinheitskontrolle der Präparation erfolgte photometrisch mit einer Agaroselösung gleicher Konzentration wie bei den Proben als Leerwert.

2.2.1.2 Restriktionsverdauung der DNA

2.2.1.2.1 Restriktionsverdauungen von DNA in Lösung

Für die Verdauungen genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen in Lösung wurden jeweils 10 µg DNA und 30 Einheiten (Units, U) des Enzyms in dem entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Das Volumen der Enzymlösung sollte 1/10 des Reaktionsansatzes nicht übersteigen, da die Restriktionsenzyme in einer 50%igen Glycerinlösung vorliegen und Glycerinkonzentrationen oberhalb 5% die Enzymaktivität beeinflussen können. Die Restriktionen wurden in der Regel über Nacht bei der für das verwendete Enzym optimalen Temperatur durchgeführt. Bei einigen Restriktionsenzymen waren auch kürzere Inkubationszeiten von 3 bis 4 Stunden ausreichend. Ein Aliquot jedes Restriktionsansatzes wurde in einer analytischen Agarosegelelektrophorese auf Vollständigkeit des Verdauens überprüft.

2.2.1.2.2 Restriktionsverdauungen von in Agarose eingebetteter DNA

Agarose kann die Enzymaktivität von Restriktionsendonukleasen stark inhibieren und behindert zudem die freie Zugänglichkeit der DNA für das Enzym. Die Standardreaktionsbedingungen für Restriktionsverdauungen müssen daher entsprechend angepaßt werden.

Anhand der Konzentrationsbestimmungen konnte für jede Präparation die Blöckchengröße ermittelt werden, die 10 µg DNA entsprach. In der Regel wurden halbe Blöckchen in die Restriktionen eingesetzt. Zunächst wurde jedes Blöckchen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TE-Puffer pH 8.0 überschichtet und für wenigstens 30 Minuten bei Raumtemperatur equilibriert. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und die Equilibrierung mehrfach mit frischem Puffer wiederholt. Danach wurden die Blöckchen in dem für das Restriktionsenzym benötigten Reaktionspuffer equilibriert. Der Restriktionsverdau erfolgte anschließend über Nacht mit 30 bis 50 Einheiten des Restriktionsenzym in 300 µl des erforderlichen Reaktionspuffers bei der jeweils optimalen Temperatur. Für Doppelverdau wurden die Blöckchen nach dem ersten Verdau entsprechend der Reaktionsbedingungen des zweiten Restriktionsenzym umgepuffert.

Alternativ zu dem Verdau in Agaroseblöckchen wurden für Restriktionsverdauungen mit häufig schneidenden Enzymen nach dem Equilibrieren mit TE-Puffer die Blöckchen für 5 Minuten bei 65°C aufgeschmolzen und anschließend auf 37°C temperiert. Eine ebenfalls auf

37°C temperierte Mischung aus der erforderlichen Menge Restriktionsenzym mit dem entsprechenden 10× Reaktionspuffer wurde nun zugegeben und vorsichtig untergemischt. Die Restriktion erfolgte über Nacht bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

2.2.1.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

2.2.1.3.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die analytische Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten erfolgte abhängig von der Länge der zu trennenden Fragmente in Gelen unterschiedlicher Agarosekonzentration. Für die Auftrennung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA wurden in der Regel 0.8 %ige Gele verwendet, für PCR-Fragmente fanden 1.4 bis 2.0 %ige Gele Verwendung.

2.2.1.3.2 Präparative Agarosegelelektrophorese

Für die Isolierung einzelner Restriktionsfragmente oder PCR-Produkte wurde die DNA über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden in der Regel 0.8 %ige low-melting-Agarosegele in 1× TAE-Puffer verwendet. Den Gelen war zum Nachweis der DNA der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugefügt. Die maximale Trennstrecke dieser Gele betrug 14 cm. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 0,8 V/cm. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Banden auf dem UV-Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt.

2.2.1.3.3 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Die PFGE erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von deutlich längeren DNA-Fragmenten als dies in konventionellen Gelelektrophoresen mit statischen Spannungsgradienten möglich ist. Im Gegensatz zu der konventionellen Agarosegelelektrophorese, bei der die Obergrenze der noch zu trennenden Fragmentlängen bei etwa 50 kb liegt, können in der PFGE auch noch DNA-Moleküle mit einer Länge von bis zu 10 Mb aufgetrennt werden. Bei der herkömmlichen Agarosegelelektrophorese beruht das Trennprinzip hauptsächlich auf den Siebeffekten der Agarosegelmatrix. Der PFGE liegt ein anderes Trennprinzip zugrunde, das von einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter beeinflusst wird. Puls-Feld-Gele reagieren ausgesprochen empfindlich auf Änderungen bereits in einem der zahlreichen Elektrophoreseparameter. Zwar ist die Pulsdauer die wichtigste Variable bei der Auftrennung großer DNA-Fragmente, jedoch wird die für eine bestimmte Trennung

erforderliche Pulsdauer von verschiedenen anderen Faktoren (z.B. Gelkonzentration, Art der Agarose, Zusammensetzung und Konzentration des Elektrophoresepuffers, Puffertemperatur, Winkel zwischen den Spannungsgradienten) beeinflusst. Die drei wichtigsten praktischen Aspekte der PFGE sind 1) der trennbare Größenbereich, 2) die zu erwartende Auflösung und 3) die für ein bestimmtes Gel benötigte Laufzeit. Diese Informationen werden am besten durch die Auftragung der Molekülmobilitäten gegen verschiedene Pulsintervalle verdeutlicht. Solche sogenannten Mobilitätsplots müssen empirisch für jede PFGE-Apparatur ermittelt werden und bilden die Grundlage für jedes PFGE-Experiment.

Die meisten Trennparameter wurden für die unterschiedlichen PFGE-Experimente weitestgehend konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Lediglich die Pulsintervalle und die Gesamtdauer der Elektrophorese wurden mit Hilfe der ermittelten Mobilitätsplots (Abb. 2-2) an die jeweiligen Erfordernisse angepaßt. Um den linear aufgetrennten Längenbereich zu erweitern, wurde bei einigen PFGE-Experimenten eine Pulsrampe verwendet, bei der die Pulsdauer über das Experiment stetig zunahm (z.B. von 5 bis 90 Sekunden). Auch hier dienten die Mobilitätsplots als Anhalt für die Festlegung der Grenzen.

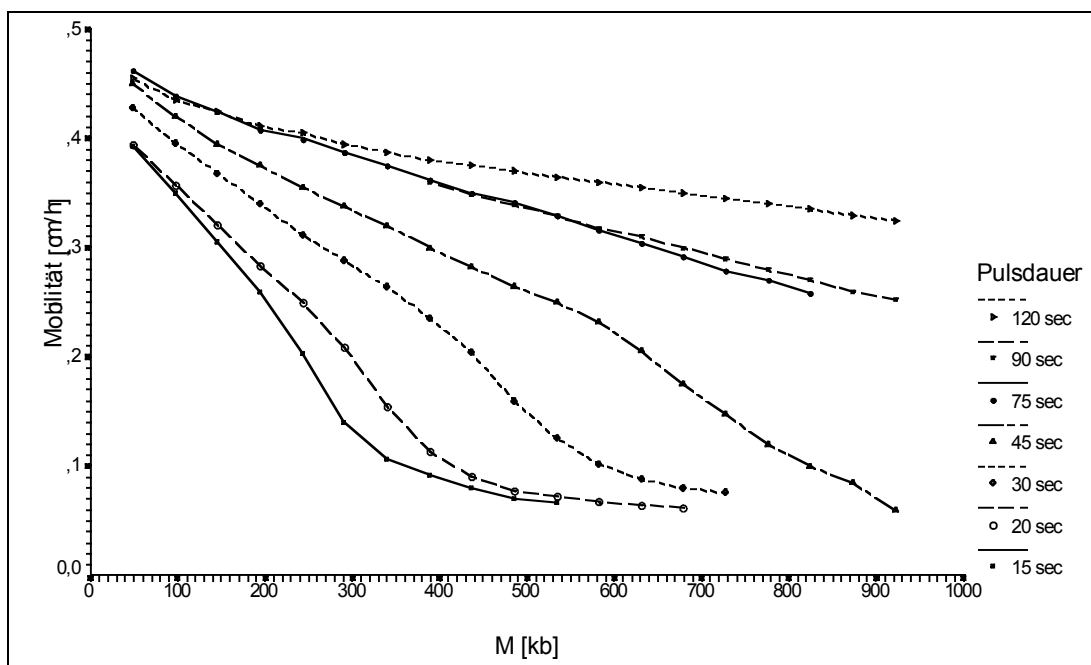


Abbildung 2-2: Mobilitätsplots für unterschiedliche Pulsintervalle; alle anderen PFGE-Parameter wurden konstant gehalten (konstanter Spannungsgradient von 6,6 V/cm, konstanter Winkel zwischen den Gradienten $\alpha = 120^\circ$, Elektrophoresepuffer 0,25× TBE, Puffertemperatur 14°C, 1%ige Agarosegele). Je Pulsdauer wurden die DNA-Mobilitäten aus mindestens drei Experimenten gemittelt.

Für die Durchführung einer PFGE wurde zunächst die Gelkammer mit 2.4 l Elektrophoresepuffer befüllt und auf 14°C vorgekühlt. Das Agarosegel wurde im Gießrahmen direkt auf den Gelträger gegossen und nach dem Erstarren an den Oberkanten mit einem Skalpell abgeschrägt, um eine gleichmäßige Umströmung des Gels in der Kammer zu ermöglichen. Die Agaroseblöckchen mit der verdauten DNA wurden nun vorsichtig in die Geltaschen überführt. Anschließend wurden alle Taschen mit aufgeschmolzener 1%iger low-melting Agarose aufgefüllt und versiegelt. Nach der Temperierung des fertigen Gels auf die Puffertemperatur in der Elektrophoresekammer, erfolgte der Start der Elektrophorese mit den zuvor eingestellten Parametern. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vom Gelträger gelöst und 5 bis 10 Minuten in einer Färbelösung mit 5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Das Gel wurde auf dem UV-Transilluminator fotografiert und anschließend für den Kapillartransfer der DNA auf einen Membranfilter vorbereitet.

2.2.1.4 Transfer der DNA auf Membranfilter

2.2.1.4.1 Kapillartransfer nach Southern

Der Kapillartransfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten auf Trägermaterialien aus Nitrozellulose- oder Nylonmembranen wurde erstmals 1975 von Southern beschrieben [105].

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst auf den zu übertragenden Bereich zugeschnitten. Durch eine Behandlung des Gels für 15 bis 20 Minuten mit 125 mM HCl bei Raumtemperatur wurde die DNA partiell depuriniert, was die Übertragung größerer DNA-Fragmente auf die Membran erleichterte. Die Denaturierung der DNA erfolgte während einer halbstündigen Inkubation des Gels in 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl. Anschließend wurde das Gel für mindestens 60 Minuten in 3 M Natriumazetat-Lösung pH 5.5 neutralisiert. In der Zwischenzeit wurde die Transferapparatur vorbereitet. Zwei mit 20× SSC pH 7.0 als Transferpuffer gefüllte Schalen dienten als Pufferreservoir. Darüber wurde eine Glasscheibe mit einem in die Reservoirs hineinreichenden, mit Transferpuffer getränkten Filterpapier als Pufferbrücke gelegt. Luftblasen zwischen Glasplatte und Filterpapier wurden mit einer Glaspipette herausgequetscht. Auf diese Pufferbrücke wurde das fertig vorbereitete Gel luftblasenfrei mit der Unterseite nach oben gelegt und an allen Seiten mit Frischhaltefolie abgedichtet, um einen Pufferstrom nur durch das Gel hindurch zuzulassen. Auf das Gel wurde nun luftblasenfrei nacheinander eine zuvor beschriftete und in ddH₂O eingeweichte

Nitrozellulose- oder Nylonmembran und drei Lagen ebenfalls mit ddH₂O getränktes Filterpapier gelegt. Hierauf folgte ein Stapel saugfähigen Papiers, der ganze Aufbau wurde mit einer Glasplatte sowie einem kleinen Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über den Zeitraum von mindestens 12 Stunden. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung von Agaroseresten kurz in 2× SSC auf dem Schüttler gewaschen. Nachdem die Membran zwischen Filterpapier getrocknet war, wurde die DNA durch Backen für 2 Stunden bei 80°C auf dem Membranfilter fixiert.

2.2.1.4.2 Alkalischer Transfer auf positiv geladene Nylonmembranen

Der alkalische Kapillartransfer von DNA auf positiv geladene Nylonmembranen bietet den Vorteil, daß die DNA bereits während des Transfers kovalent an die Membran bindet und so eine nachträgliche Fixierung der DNA durch UV-Bestrahlung oder Backen des Filters unnötig ist.

Wie beim herkömmlichen Southern-Transfer wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst auf den zu übertragenden Bereich zugeschnitten. Zur Erleichterung der Übertragung größerer DNA-Fragmente auf die Membran erfolgte anschließend die partielle Depurinierung der DNA während einer fünfzehnminütigen Behandlung des Gels mit 125 mM HCl bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nachdem das Gel kurz mit ddH₂O gespült wurde, konnte die Transferapparatur entsprechend der beim Southern-Transfer aufgebaut werden. Als Transferpuffer diente hier 0.4 n NaOH, und es fanden ausschließlich positiv geladene Nylonmembranen Verwendung. Der Transfer erfolgte über Nacht für wenigstens 12 Stunden. Anschließend wurde die Membran mit Markierungen für die Lage der Geltaschen versehen und für 30 Minuten in 2× SSC geschüttelt. Danach wurde der Membranfilter zwischen Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.5 Hybridisierung der filtergebundenen DNA

2.2.1.5.1 Nick-Translation einer Gensonde

Die erstmals 1977 von Rigby [106] beschriebene Methode der Nick-Translation beruht auf einer Eigenschaft der DNase I, die bei niedrigen Enzymkonzentrationen und in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen in einem doppelsträngigen DNA-Substrat an statistisch verteilten Stellen Einzelstrangsnitte, sogenannte „nicks“, erzeugt. Ein zweites Enzym, die *E. coli* DNA-Polymerase I, kann ausgehend von diesen Einzelstrangsnitten in 5'→3'-Richtung einen

neuen DNA-Strang synthetisieren, der zum intakten, ersten Strang komplementär ist. Hierbei werden die Nukleotide in Syntheserichtung durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt und dann durch die Polymerase-Aktivität wieder ersetzt. Als Substrat angebotene, radioaktiv oder chemisch markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate werden in den neusynthetisierten Strang eingebaut.

Für die Hybridisierung genomischer Southern Blots wurden auf Eis zu 100 ng der zu markierenden DNA 2 µl des 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers, 3 µl einer Mischung der drei nicht markierten Desoxyribonukleosidtriphosphate (jedes 0.13 mM) und 30 µCi des [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten dCTP (bzw. in einigen Experimenten dATP) gegeben. Das Volumen der Mischung wurde mit Wasser auf 18 µl ergänzt und die Markierung durch Zugabe von 2 µl Enzymgemisch (DNA-Polymerase I/DNase I in 50% Glycerin) gestartet. Nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation bei 15°C wurde die Reaktion mit 80 µl TE-Puffer pH 8.0 versetzt und die nicht eingebauten Nukleotide über eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 abgetrennt.

2.2.1.5.2 Random Primed Markierung einer Gensonde

Bei kürzeren DNA-Fragmenten (< 500 bp) werden mit der „random primed“ Markierung nach Feinberg [107, 108] höhere Einbaueffizienzen erreicht, als dies über Nick-Translation möglich ist. Als Substrat dient hierbei linearisierte und denaturierte, also einzelsträngige DNA. An diese wird ein Gemisch aus Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen hybridisiert, das praktisch alle Sequenzkombinationen enthält. Diese Hexanukleotide binden in statistischer Verteilung an die eingesetzte DNA und dienen dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* als „random primer“ für die Synthese des komplementären Stranges in 5'→3'-Richtung. Dabei werden die als Substrat angebotenen radioaktiv oder chemisch markierten Desoxyribonukleosidtriphosphate in die neusynthetisierte DNA eingebaut.

Die zu markierende linearisierte DNA wurde für 10 Minuten bei 95°C und anschließendes Abkühlen auf Eis denaturiert. Auf Eis wurden zu 100 ng der denaturierten DNA 2 µl des 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers, 3 µl einer Mischung der drei nicht markierten Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dGTP und dTTP (jedes 0.16 mM), 2 µl des Hexanukleotidgemisches und 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP gegeben. Das Volumen der Mischung wurde mit Wasser auf 19 µl ergänzt und die Markierung durch Zugabe von 1 µl Klenow-

Enzym gestartet. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 80 µl TE-Puffer pH 8.0 versetzt und die nicht eingebauten Nukleotide über eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 abgetrennt.

2.2.1.5.3 Hybridisierung der Membranfilter

Die Membranfilter wurden in 2× SSC angefeuchtet und in eine mit 2× SSC gefüllte Hybridisierungsrollerflasche überführt. Nach dem Andrücken des Filters an die Wandung der Flasche zur Entfernung von Luftblasen wurde die Lösung abgegossen und 10 ml der auf 68°C temperierten Hybridisierungslösung zugegeben. Die Flasche wurde nun mit einem Silikonstopfen verschlossen und die Filter in der Regel für 2 bis 3 Stunden bei 68°C im Hybridisierungsrollerschrank prähybridisiert. Kurz vor Ende der Prähybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die denaturierte Sonde wurde zu der Hybridisierungslösung in die Rollerflasche pipettiert und die Hybridisierung bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur für wenigstens 12 bis 16 Stunden durchgeführt.

Vor dem Waschen des Filters wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und der Filter in der Rollerflasche mit 20 ml 2× SSC gespült. Danach wurde der Filter in eine Plastikschale überführt und darin mit 2× SSC/0.1% SDS für 30 Minuten bei der verwendeten Hybridisierungstemperatur im Schüttelwasserbad gewaschen. Dieser Schritt wurde mit frischer Waschlösung wiederholt. Danach wurde die Stringenz der Waschschrte bei 68°C durch Verwendung von 1× SSC/0.1% SDS, 0.5× SSC/0.1% SDS und gegebenenfalls 0.1× SSC/0.1% SDS erhöht. Zwischen den einzelnen Waschschrten erfolgte mit einem Handmonitor die Kontrolle der noch auf dem Filter gebundenen Radioaktivität sowie der Radioaktivität in der Waschlösung, um die Stringenz der folgenden Waschschrte entsprechend anpassen zu können.

Die Filter wurden entweder noch feucht in Haushaltsfolie eingewickelt oder getrocknet und mit Verstärkerfolie bei -80°C autoradiographiert. Die Expositionsdauer der Filme richtete sich nach der Stärke der Signale und variierte zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen bis Wochen.

2.2.1.5.4 Entfernen der Sonde von hybridisierten Nylonmembranen

Um einen bereits hybridisierten Membranfilter für eine erneute Hybridisierung zu verwenden, mußte die alte Hybridisierungssonde entfernt werden. Hierzu wurde die Nylonmembran mehrfach bei 42°C in 0.2 n Natronlauge gewaschen bis mit dem Handmonitor keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Anschließend wurde der Filter zur Neutralisation in 2× SSC gewaschen und über Nacht autoradiographiert, um die Vollständigkeit der Sondenentfernung zu überprüfen. Anschließend wurde der Filter wie unter 2.2.1.5.3 beschrieben mit der neuen Sonde hybridisiert.

2.2.1.5.5 Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotidsonden

2.2.1.5.5.1 5'-Endmarkierung einer Gensonde

Synthetische Oligonukleotide werden ohne Phosphatgruppen an ihren 5'-Enden synthetisiert und können daher einfach und sehr effizient durch die Übertragung der γ -³²P-Gruppe von [γ -³²P]-ATP auf das 5'-Ende des Oligonukleotids durch die T4-Polynukleotid-Kinase markiert werden.

Für die Markierungsreaktionen wurden jeweils 10 pmol des synthetischen Oligonukleotids mit 2 µl des zehnfach konzentrierten T4-Polynukleotid-Kinase-Reaktionspuffers und 50 µCi [γ -³²P]-ATP vermischt. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 19 µl aufgefüllt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 45 Minuten. Das Enzym wurde nun durch Erhitzen des Reaktionsansatzes für 10 Minuten auf 95°C deaktiviert. Danach wurde nach Zugabe von 80 µl TE-Puffer pH 8.0 das markierte Oligonukleotid über eine Sephadex G50-Gelfiltration von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt. Die Einbaueffizienz wurde über einen Handmonitor grob abgeschätzt. Die Sonde wurde nun entweder direkt in ein Hybridisierungsexperiment eingesetzt oder bis zur Verwendung am nächsten Tag bei -20°C gelagert.

2.2.1.5.5.2 Markierung einer Gensonde mittels PCR

Für die besonders effiziente Markierung gerade von kurzen Oligonukleotidsonden bietet sich die Markierung mittels PCR an. Hierbei wird das Oligonukleotid mit spezifischen Primern vervielfältigt und die neusynthetisierte DNA mit [α -³²P]dCTP markiert.

Für die Markierung der Δ 44-Sonde wurden in einem 20 µl PCR-Ansatz 5 pmol des synthetischen Oligonukleotids als Template-DNA und 50 µCi [α -³²P]dCTP eingesetzt. Nach

einer initialen Denaturierung für 3 Minuten bei 95°C erfolgte die Markierung der Sonde in 10 - 20 Amplifikationsrunden, bestehend aus dem Annealing für 30 Sekunden bei 30°C, sowie einer Extension bei 72°C für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Produkte nochmals für 10 Minuten bei 72°C verlängert und die Reaktion dann auf 4°C herabgekühlt. Nach der Reaktion erfolgte durch eine Sephadex G50-Gelfiltration die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide. Die Sonde wurde durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt.

2.2.1.5.5.3 Hybridisierung der Membranfilter

Die Membranfilter wurden in 2× SSC angefeuchtet und in eine mit 2× SSC gefüllte Hybridisierungsrollerflasche überführt. Nach dem Andrücken des Filters an die Wandung der Flasche zur Entfernung von Luftblasen wurde die Lösung abgegossen und 10 ml der auf 68°C temperierten Hybridisierungslösung zugegeben. Die Flasche wurde nun mit einem Silikonstopfen verschlossen und die Filter für 2 bis 3 Stunden bei 68°C im Hybridisierungsrollerschrank prähybridisiert. Nun wurde die denaturierte Sonde zu der Hybridisierungslösung in die Rollerflasche pipettiert und die Hybridisierung bei 68°C für wenigstens 12 bis 16 Stunden durchgeführt.

Vor dem Waschen des Filters wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und der Filter in der Rollerflasche mit 6× SSC gespült. Danach wurde der Filter in eine Plastikschaale überführt und darin mit 6× SSC für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Schüttelwasserbad gewaschen. Dieser Schritt wurde noch zwei Mal mit frischer Waschlösung wiederholt. Zwischen den einzelnen Waschsritten erfolgte mit einem Handmonitor die Kontrolle der noch auf dem Filter gebundenen Radioaktivität sowie der Radioaktivität in der Waschlösung. Mit einem anschließenden, höher stringenten „hot wash“ für 60 bis 90 Sekunden in 6× SSC bei 60°C wurde ein Großteil an unspezifisch gebundener Sonde entfernt. Die Filter wurden noch feucht in Haushaltsfolie eingewickelt und mit Verstärkerfolie bei -80°C autoradiographiert. Die Expositionsdauer der Filme richtete sich nach der Stärke der Signale und variierte zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen bis Wochen.

2.2.1.6 Hybridisierung von DNA in Agarosegelen

2.2.1.6.1 Trocknung der Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Ethidiumbromidlösung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) gefärbt und zur Dokumentation fotografiert. Danach wurden sie 30 Minuten gewässert und anschließend auf ein mit weichem Bleistift beschriftetes Filterpapier überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entfernung letzter Flüssigkeitsreste erfolgte während einer einstündigen Trocknung auf der Vakuumtrockenapparatur bei maximal 60°C . Danach konnte das auf dem Filterpapier haftende Gel bis zur weiteren Verwendung in Folie geschlagen bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.1.6.2 Hybridisierung der DNA im Gel mit radioaktiv markierten Gensonden

Das getrocknete Gel wurde zunächst in einer Plastikschaale in 300 ml Wasser eingeweicht, bis es sich vom Filterpapier löste. Danach wurde es in eine Schale mit 300 ml Denaturierungslösung überführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Denaturierung der DNA wurde das Gel zur Neutralisation mit 300 ml der Neutralisationslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde es in eine mit $6\times$ SSC gefüllte Hybridisierungsrollerflasche überführt und darin für wenigstens eine Stunde equilibriert. Zur Hybridisierung wurde nun das $6\times$ SSC abgegossen und durch 20 ml Hybridisierungspuffer ersetzt. Die radioaktiv markierte Sonde wurde zupipettiert und die Hybridisierungsrollerflasche mit einem Silikonstopfen fest verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte in der Regel über Nacht bei 39°C .

Zum Waschen wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und das Gel zunächst mit 20 ml $6\times$ SSC gespült. Danach wurde die Hybridisierungsflasche mit $6\times$ SSC gefüllt und das Gel darin für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurde das Gel mit 20 bis 50 ml frischer Hybridisierungslösung in der fest verschlossenen Rollerflasche für 30 Minuten bei 39°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Gegebenenfalls wurde auch dieser Schritt wiederholt. Zum Schluß wurde das Gel kurz in $6\times$ SSC gespült und noch feucht in Plastiktüten eingeschweißt. Die Autoradiographie erfolgte in der Regel mit Verstärkerfolie über Nacht bei -80°C .

2.2.1.6.3 Entfernen einer Gensonde von erneut zu hybridisierenden Gelen

Zur Entfernung einer radioaktiven Sonde von einem bereits hybridisierten Gel vor einer erneuten Hybridisierung wurde das Gel mit 50 ml der Waschlösung für 30 bis 60 Minuten bei 65°C in einer gut verschlossenen Hybridisierungsflasche im Hybridisierungsrollerofen inkubiert. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, bis im Gel mit dem Handmonitor keine Radioaktivität mehr nachzuweisen war. Zur Überprüfung wurde das Gel zusätzlich über Nacht autoradiographiert. In der Regel ließen sich die Hybridisierungssonden auf diese Art quantitativ herunterwaschen. Vor einer erneuten Hybridisierung mußte das Gel wieder denaturiert, neutralisiert und equilibriert werden.

2.2.2 Untersuchung von MHC Klasse I Genen mittels Polymerasekettenreaktion

2.2.2.1 PCR-Analyse genomischer DNA

Die PCR-Analyse genomischer DNA erfolgte mit den für die jeweiligen Primerpaare optimierten Reaktionsbedingungen. Das Reaktionsvolumen betrug zwischen 30 und 50 µl. Jeder Ansatz enthielt 25 ng genomische DNA, den Reaktionspuffer mit 1.5 mM MgCl₂, beide Primer (je 1 µM), eine Mischung der dNTP (jedes 200 µM), 2.5 Einheiten *Taq* DNA-Polymerase und steriles ddH₂O entsprechend dem jeweiligen Endvolumen. Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 95°C während 35 PCR-Zyklen, bestehend aus einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C, dem Annealing für eine Minute bei der Annealingtemperatur der jeweiligen Primer, sowie einer Extension bei 72°C für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Produkte nochmals für 10 Minuten bei 72°C verlängert und die Reaktion dann auf 4°C herabgekühlt. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden je nach deren Fragmentlänge 1 bis 2%ige Agarosegele verwendet.

2.2.2.2 PCR-Analyse von Cosmid- und Plasmid-DNA

Für die Untersuchung von Cosmid- oder Plasmid-DNA wurden erheblich geringere DNA-Mengen benötigt, als bei der Untersuchung genomischer DNA. Es wurden 5 bis 10 ng DNA pro Ansatz verwendet. Außerdem konnte die Zahl der PCR-Zyklen auf 30 reduziert werden. Die übrigen Bedingungen entsprachen denen bei der Analyse von genomischer DNA.

2.2.2.3 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Jede handelsübliche *Taq* DNA-Polymerase synthetisiert an den 3'-Enden der PCR-Produkte einen Überhang aus einem einzelnen Desoxyadenosinrest (A). Die Technik der TA-Klonierung von PCR-Produkten macht sich diese von der verwendeten Template-DNA unabhängige Eigenschaft der *Taq* Polymerase zunutze. Ein linearisierter und leicht modifizierter Klonierungsvektor, der an seinen 3'-Enden Überhänge aus jeweils einem einzelnen Desoxythymidinrest (T) trägt, ermöglicht die effiziente Ligation der PCR-Produkte in den Vektor.

Für die Ligation wurden ausschließlich frisch amplifizierte PCR-Produkte verwendet, die nicht älter als einen Tag waren. Der Ansatz enthielt 1 bis 2 μ l des PCR-Produktes, 1 μ l des zehnfach konzentrierten Ligase-Puffers, 50 ng Vektor-DNA, 4 Weiss-Einheiten der T4 DNA-Ligase und ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 μ l. Die Reaktion wurde für mindestens vier Stunden, in der Regel aber über Nacht bei 14°C inkubiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde am folgenden Tag in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, der Rest konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.3 Untersuchung klonierter DNA

2.2.3.1 Präparation von Cosmid- oder Plasmid-DNA

2.2.3.1.1 Schnellpräparation kleinerer DNA-Mengen

Für die Schnellpräparation kleinerer DNA-Mengen wurden zum Animpfen von 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum entweder Glycerinkulturen entnommene Aliquots verwendet oder von LB-Agarplatten isolierte Einzelkolonien. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 30°C auf dem Schüttelinkubator angezogen.

Die Präparation folgte der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse [109]. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6000 \times g geerntet und das Zellpellet sorgfältig in 100 μ l Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lösung II wurde vorsichtig durch Umschwenken gemischt und die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Durch Versetzen des Lysats mit 150 μ l Lösung III wurden Proteine und chromosomale DNA präzipitiert und anschließend bei 13000 \times g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mit Isopropanol die Cosmid- bzw. Plasmid-DNA ausgefällt und durch erneute Zentrifugation bei 13000 \times g gewonnen. Ohne die DNA zu trocknen wurde sie in

50 μ l ddH₂O mit 10 μ g/ml RNase aufgenommen und vorhandene RNA binnen einer Stunde bei 37°C abgebaut. Anschließend folgte eine Fällung mit 2 Volumen Ethanol. Nach Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l TE pH 8.0 aufgenommen.

2.2.3.1.2 Präparation extrachromosomaler DNA in größerem Maßstab

Die Präparation von größeren Mengen extrachromosomaler DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des Nucleobond DNA-Aufreinigungskit der Fa. Macherey-Nagel. Nach der alkalischen Lyse wird die extrachromosomale DNA nicht durch Isopropanol ausgefällt, sondern in einer Säulenchromatographie über eine Silikamatrix aufgereinigt. Der Reinheitsgrad der so erhaltenen DNA ist sehr hoch und genügt den Ansprüchen aller nachfolgenden Experimente.

Von den Bakterien mit dem zu isolierenden Cosmid oder Plasmid wurden über Nacht 10 ml-Vorkulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angezogen. Von diesen wurden dann 500 ml-Hauptkulturen angeimpft, die ebenfalls über Nacht angezogen wurden. Die Bakterienernte erfolgte durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 6000 \times g. Das Pellet wurde sorgfältig in 24 ml Puffer S1 aufgenommen. Nach Zugabe von 24 ml Puffer S2 wurde behutsam gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 24 ml Puffer S3 zugemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde die Suspension bei 12000 \times g und 4°C für 40 Minuten abzentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Chromatographiesäule. Nach Equilibrierung der Säule mit 5 ml Puffer N2 wurde das abzentrifugierte, klare Lysat auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde aufgefangen und zur Erhöhung der Ausbeute ein zweites Mal aufgetragen. Nun wurde die Säule dreimal mit je 12 ml Puffer N3 gewaschen und die DNA schließlich mit zweimal 6 ml Puffer N5 eluiert. Zur Fällung der DNA wurden 0.7 Volumen Isopropanol zugegeben und die Mischung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 \times g und 4°C für 40 Minuten wurde das DNA-Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in TE-Puffer pH 8.0 aufgenommen.

2.2.3.2 Restriktionsverdauung klonierter DNA

Für Restriktionsanalysen von Cosmid- oder Plasmid-DNA wurde zwischen 0.3 und 1 µg DNA mit Restriktionsenzym in dem entsprechenden Reaktionspuffer geschnitten und anschließend in 0.8 bis 1.2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Bei Doppelverdauungen wurde die DNA zunächst mit dem Enzym geschnitten, dessen Reaktionspuffer die geringere Salzkonzentration aufwies. Im Anschluß an diesen ersten Verdau wurde das Reaktionsvolumen verdoppelt und die Salzkonzentration im Ansatz entsprechend der Erfordernisse für das zweite Restriktionsenzym erhöht. Nun erfolgte der zweite Restriktionsverdau. Ein Aliquot der Reaktion wurde auf Vollständigkeit des Verdaus überprüft, bevor der Rest des Ansatzes weiterverwendet wurde.

2.2.3.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wurde die DNA zunächst über eine präparative Gelelektrophorese in einem 0.8%igen low-melting Agarosegel aufgetrennt. Auf einem UV-Transilluminator wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das die DNA enthaltende Agaroseblöckchen wurde mit einem Volumen ddH₂O versetzt und bei 68°C im Wasserbad aufgeschmolzen. Aus der geschmolzenen Agarose wurde die DNA nun mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die DNA in TE-Puffer pH 8.0 suspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Für eine effiziente Ligation sollten Klonierungsvektor und das zu klonierende DNA-Fragment kompatible Enden aufweisen. Daher wurde für die Vorbereitung des Klonierungsvektors das gleiche Enzym gewählt, das zuvor bei der zu klonierenden DNA verwendet wurde. Nach der Linearisierung des Vektors wurden seine 5'-Enden zur Vermeidung einer Religation durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die hitzedeaktivierte alkalische Phosphatase wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt, die Vektor-DNA gefällt und in TE-Puffer pH 8.0 aufgenommen. Zur Ligation wurden Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment in einem äquimolaren Verhältnis zusammengegeben und in Ligationspuffer mit 5 bis 10 Einheiten T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14°C ligiert.

2.2.3.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Bakterienzellen müssen durch eine besondere Behandlung für die Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet werden; sie werden dann als „kompetente Zellen“ bezeichnet. Je nach Transformationsmethode existieren hierfür unterschiedliche Protokolle.

2.2.3.5.1 Präparation kompetenter Zellen nach Cohen et al.

Diese Methode zur Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen ist eine vereinfachende Abwandlung der Vorschrift von Cohen [110]. Mit ihr sollen Transformationsraten von 5×10^6 bis 2×10^7 Transformanden pro μg DNA erreicht werden können. Von den zu transformierenden Bakterien wurde zunächst über Nacht eine Vorkultur in LB-Medium angezogen. Für die 50 ml-Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:100 in LB-Medium verdünnt. Nun wurden die Bakterien unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{550} von 0.5 angezogen. Die Kultur befand sich dann in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei $3000 \times g$ und 4°C geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml 50 mM $\text{CaCl}_2/10$ mM Tris-HCl pH 8.0 resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis stehengelassen. Anschließend wurden die Bakterien für 15 Minuten bei $3000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert und das Pellet diesmal in 3.3 ml 50 mM $\text{CaCl}_2/10$ mM Tris-HCl pH 8.0/15% Glycerin (v/v) aufgenommen. Nun wurden die kompetenten Zellen in Aliquots zu je 250 μl aufgeteilt und entweder direkt transformiert oder zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.5.2 Präparation elektrokompeter Zellen

Die Methode der Elektroporation wurde ursprünglich entwickelt, um DNA in Eukaryontenzellen einzuschleusen, wird aber auch für die Transformation von Bakterienzellen wie z.B. *E. coli* eingesetzt. Es können Transformationsraten von 10^9 bis 10^{10} Transformanden pro μg DNA erreicht werden [111]. Zunächst wurde von den zu transformierenden Bakterien eine Vorkultur in 10 ml LB-Medium angezogen. Hiervon wurde 1 l LB-Medium für die Hauptkultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD_{600} von 0.5 bis 0.8 bei 37°C und 120 UpM angezogen. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien für 15 Minuten bei $3000 \times g$ und 4°C wurden die Pellets auf Eis in 1 l 10% Glycerin aufgenommen. Durch mehrfache Wiederholung dieses Waschschrilles aus Zentrifugation und anschließendem Aufnehmen der Pellets in schrittweise reduziertem Volumen an 10% Glycerin wurden die Bakterien

aufkonzentriert und zugleich die Ionenstärke der Suspension vermindert. Schließlich wurden die nunmehr als elektrokompent zu bezeichnenden Bakterien in 2 ml 10% Glycerin aufgenommen, zu je 50 μ l in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA

2.2.3.6.1 Transformation über Hitzeschock

Die kompetenten Bakterienzellen wurden gegebenenfalls auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde zugegeben und behutsam mit der Pipettenspitze untergemischt. Nach einer Inkubationsphase von 40 Minuten auf Eis wurden die Bakterien für 3 Minuten in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Bakterien für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Jeweils 200 μ l dieser Kultur wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. Von einzelnen Kolonien wurden DNA-Schnellpräparationen durchgeführt um die Transformation zu überprüfen.

2.2.3.6.2 Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, in der Kälte mit 1-10 μ l Ligationsansatz versetzt und eine weitere Minute auf Eis stengelassen. Dann wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0.2 cm Elektrodenabstand überführt und in der Elektroporationsapparatur dem Spannungspuls ausgesetzt. Die eingestellten Parameter waren hierbei:

$$\begin{aligned}C &= 250 \mu\text{F} \\t &= 7.5 \text{ ms} \\E &= 12.5 \text{ kV/cm}\end{aligned}$$

Sofort nach dem Puls wurde 1 ml eiskaltes SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 180 UpM geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.2.3.7 Sequenzierung von Restriktionsfragmenten

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger (1977) beschriebenen Methode des Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide. Es wurde der "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" der Fa. USB verwendet und entsprechend der Herstellerangaben verfahren.

2.2.3.7.1 Denaturierung der doppelsträngigen DNA

Da die DNA-Polymerase als Substrat Einzelstrang-DNA benötigt, mußte die doppelsträngige Plasmid-DNA vor der Sequenzierungsreaktion durch eine Denaturierung in ihre Einzelstränge aufgespalten werden.

Zu 2-5 µg DNA wurden 0.1 Volumen 2 M NaOH/2 mM EDTA gegeben und die Mischung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumazetat pH 4.5 wurde die DNA gefällt und schließlich in 7 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.3.7.2 Annealing der Sequenzierungsprimer an die Template-DNA

Zu der denaturierten, einzelsträngigen DNA in 7 µl ddH₂O wurden 2 µl Reaktionspuffer und 1 µl des Sequenzierungsprimers (0.5 pmol/µl) gegeben. Zur Anlagerung des Sequenzierungsprimers an die Template-DNA wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

2.2.3.7.3 Markierung der DNA mit [α -³⁵S]-dATP

Zu dem eiskalten Annealing-Ansatz wurden 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl einer Mischung aus den drei unmarkierten Desoxynukleotiden dCTP, dGTP und dTTP (jedes 1.5 µM) sowie 1 µl des [α -³⁵S]-dATP (10 µCi/µl) gegeben. Die Markierung wurde durch Zugabe von 2 µl der 1:8 verdünnten Sequenase-DNA-Polymerase gestartet und erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

2.2.3.7.4 Terminationsreaktion

Sofort nach der fünfminütigen Inkubation zur Markierung der DNA wurden 3.5 µl Aliquots des Ansatzes in zuvor auf 37°C temperierte Reaktionsgefäße mit jeweils 2.5 µl eines der vier Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP gegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Terminationsreaktionen durch die Zugabe von 4 µl Stop-Lösung beendet. Die fertigen Reaktionen wurden nun über Nacht bei -20°C gelagert oder direkt in die Sequenziergelelektrophorese eingesetzt.

2.2.3.7.5 Sequenziergelelektrophorese

Die Auftrennung der Sequenzierreaktionen erfolgte in denaturierenden 6-8 %igen Polyacrylamidgelen. Für ein 70 ml-Gel wurden 29.4 g Harnstoff unter Erwärmen in etwa 50 ml ddH₂O gelöst und dann mit den übrigen Komponenten vermischt. Die fertige Gellösung enthielt 6-8 % Polyacrylamid, 1× TBE-Puffer und war 8 M an Harnstoff. Nachdem die Polymerisation durch Zugabe von 300 µl 10% APS und 30 µl TEMED gestartet worden war, wurde das Gel zügig und unter Vermeidung von Luftblasen zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde es in die Sequenzierapparatur eingespannt und mit 1× TBE als Laufpuffer und einer Leistung von 55-60 W bis zum Erreichen der Lauftemperatur von 50°C vorlaufen gelassen. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgeschreckt und auf das Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Glasplatten getrennt und das Gel zur Entfernung des Harnstoffs für 10 Minuten mit 10% Essigsäure/20% Ethanol fixiert. Schließlich wurde das Gel auf Filterpapier überführt und für 2 Stunden bei 80°C auf der Vakuumtrockenapparatur getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte meist über Nacht bei Raumtemperatur.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung von Lage und Größe der genomischen Deletionen der *RT1*-Haplotypen *lm1* und *lm3*

Die Untersuchung der *RT1.C/E*-Region mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) zielte primär auf die Aufklärung von Lage und Größe der genomischen Deletionen der *RT1*-Haplotypen *lm1* und *lm3*. Die hierfür durchgeführten Analysen galten gleichzeitig der weiteren Charakterisierung des *RT1^l*-Haplotyps der LEW-Ratte, der für eine Vielzahl varianter, rekombinanter und mutanter *RT1*-Haplotypen als Referenzhaplotyp dient.

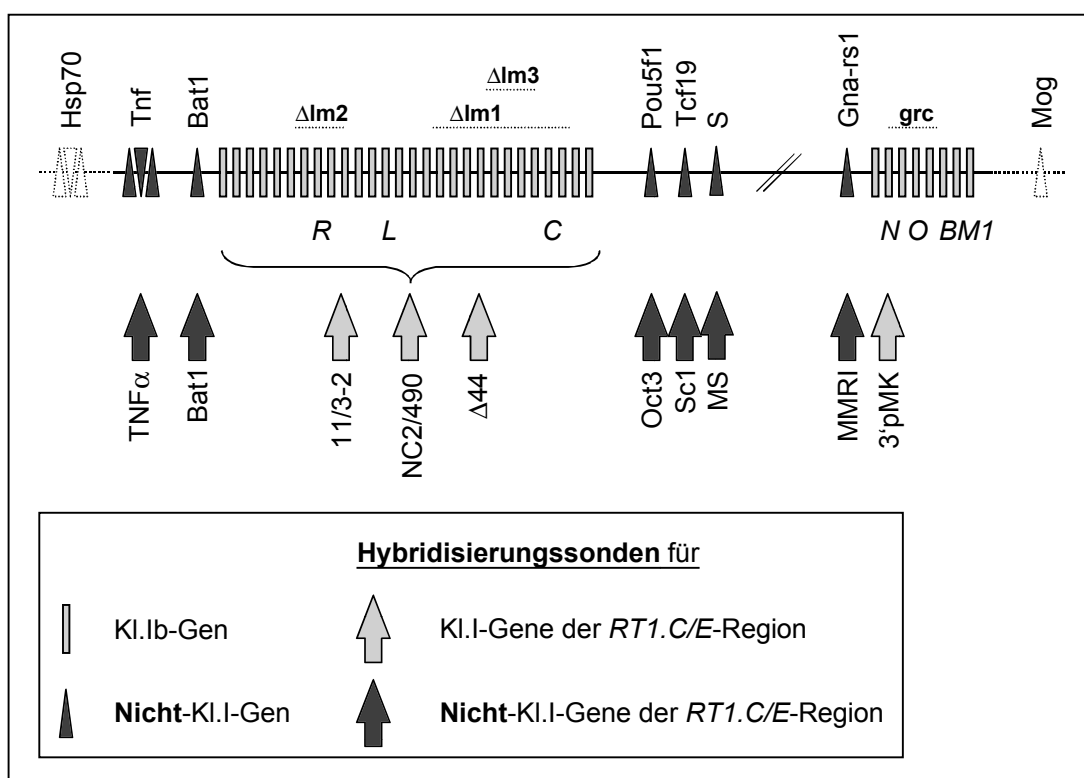


Abbildung 3-1: Verwendete Sonden für die *RT1.C/E*-Region (schematische Darstellung). Eingezeichnet sind die untersuchten Deletionen ($\Delta lm1$ etc.), die *grc*-Region, verschiedene Klasse I-Genorte (*R*, *L*, *C*, *N*, *O* und *BM1*) sowie verschiedene Nicht-Klasse I-Marker (Tnf, Bat1 etc.). Die verwendeten Hybridisierungssonden jeweils unterhalb der Lage der betreffenden Gene vermerkt. Neben den hier genannten Sonden wurde noch pWW6.3 zum allgemeinen Nachweis von Klasse I-Genen eingesetzt. Gestrichelt dargestellt sind die zentromer bzw. telomer jeweils nächstgelegenen Marker (Hsp70 bzw. Mog).

Für die *lm1*-Mutante wurde bei ihrer ersten molekulargenetischen Beschreibung anhand von RFLP-Untersuchungen gezeigt, daß gegenüber dem Parentalhaplotyp *RT1^l* eine Reihe von mit Klasse I Sonden hybridisierenden Fragmenten fehlt [75]. Die Größe der in den

Anfangsbereich der *RT1.C/E*-Region kartierenden, genomischen Deletion im *lm1*-Haplotyp wurde aufgrund dieser Befunde mit mindestens 100 kb angegeben.

Ein weiterer mutanter *RT1*-Haplotyp, *lm3*, trägt eine kleinere Deletion von mindestens 15 kb, die in den gleichen Abschnitt der *RT1.C/E*-Region kartiert wurde, wie die *lm1*-Deletion. Weder die genaue Lage noch die Größe dieser Deletionen ist bislang bekannt. Daher war das Untersuchungsziel der PFGE-Analysen mit Hilfe der verfügbaren Marker die Größe und Lage der genomischen Deletionen in *lm1* und *lm3* zu bestimmen.

3.1.1 Untersuchung der zentromeren Grenze der *RT1.C/E*-Region

Für die wegen ihrer Lage an der zentromeren Grenze der *RT1.C/E*-Region wichtigen Markergene *Tnf α* und *Bat1* wurde im Zuge der Untersuchungen ein *MluI*-Polymorphismus zwischen den Haplotypen *RT1^l*, *RT1^u* und *RT1ⁿ* gefunden.

Tabelle 3-1: *MluI*-Fragmente¹⁾ nach Hybridisierung mit Sonden für *Bat1* und *Tnf α* .

Fragmentlänge [kb]	Haplotyp								
	<i>l</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>lv3</i>	<i>lm2</i>	<i>u</i>	<i>r14</i>	<i>r15</i>	<i>n</i>
225	+	+	+	-	-	-	+	-	-
150	-	-	-	+	+	+	-	+	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	+

¹⁾In allen betrachteten Haplotypen lagen die Gene für *Tnf α* und *Bat1* jeweils auf einem gemeinsamen *MluI*-Fragment. Das hybridisierende Fragment ist zwischen den Haplotypen *RT1^l*, *RT1^u* und *RT1ⁿ* polymorph.

In jedem der analysierten Haplotypen lagen beide Markergene auf einem gemeinsamen, haplotypspezifischen *MluI*-Fragment (Abb. 3-2) Anhand der dabei auftretenden Fragmentlängen ließen sich die Haplotypen *l*, *u* und *n* klar voneinander unterscheiden. Das mit beiden Sonden hybridisierende *MluI*-Fragment des *l*-Haplotyps, das auch in *lm1*, *lm3* und *r14* nachgewiesen wurde, lag bei 225 kb. Die Haplotypen *r15*, *lv3* und *lm2* besaßen das gleiche haplotypspezifische *MluI*-Fragment wie *RT1^u*. Es hatte eine Länge von 150 kb und wich damit deutlich von dem entsprechenden *RT1^l*-Fragment ab. Im *n*-Haplotyp hybridisierte ein noch kürzeres *MluI*-Fragment bei 50 kb ebenfalls mit beiden Sonden. Dieses Fragment zeigte zumindest für den *n*-Haplotyp, daß die Genorte von *Tnf α* und *Bat1* in der Ratte nicht weiter als 50 kb auseinander liegen.

Der gefundene Polymorphismus ermöglicht die molekulargenetische Unterscheidung von drei wichtigen *RT1*-Haplotypen am Anfang der *C/E*-Region.

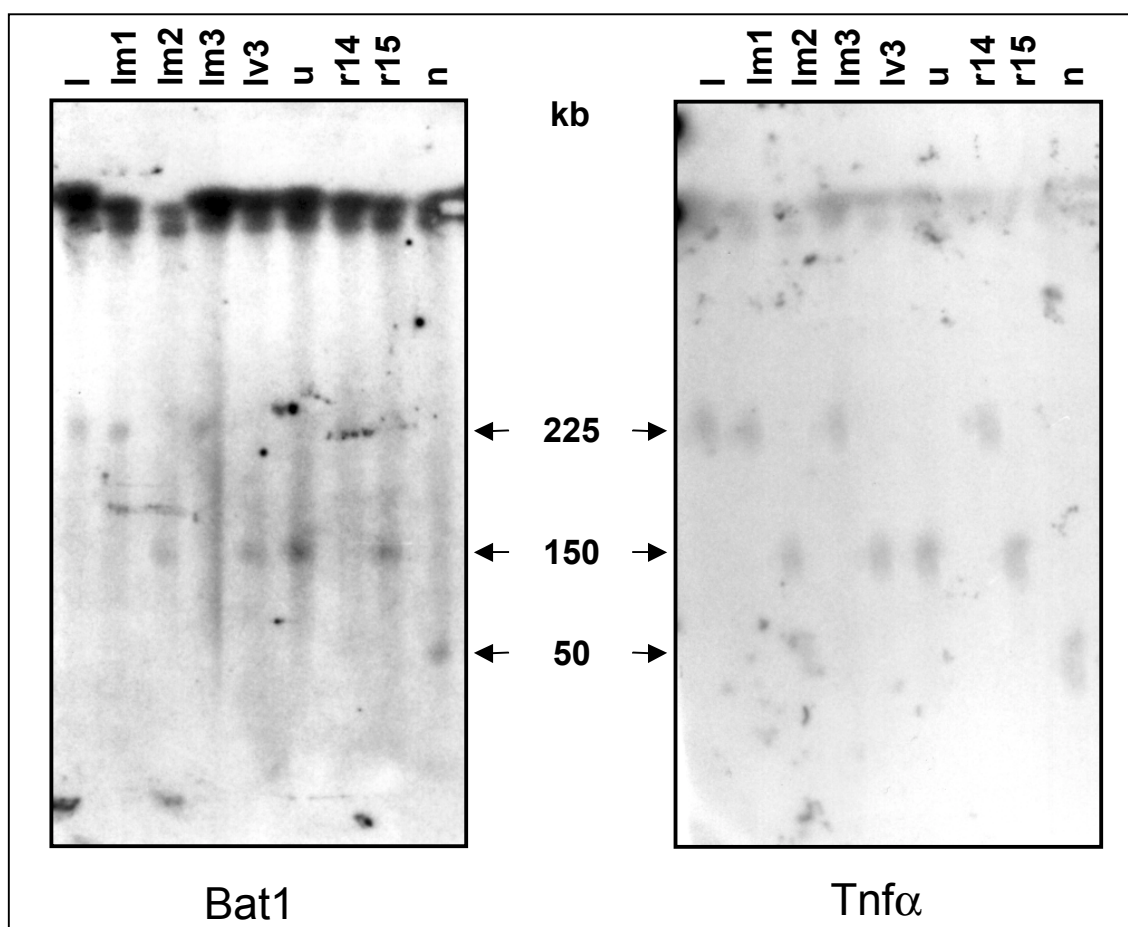


Abbildung 3-2: Bat1- und Tnf α -Polymorphismus nach MluI-Verdauung von genomischer DNA aus Rattenlebern verschiedener RTI-Haplotypen. In allen untersuchten Haplotypen hybridisierten beide Sonden auf einem gemeinsamen, jeweils haplotypspezifischen Fragment. Im Haplotyp *l* lag dieses Fragment bei 225 kb, im *u*-Haplotyp bei 150 kb und im *n*-Haplotyp bei 50 kb.

Da die *l*-spezifische Bande bei 225 kb auch in *lm1* und *lm3* auftrat, mußte in diesen Haplotypen zwischen dem Genort von *Bat1* und dem Anfang der Deletionen zumindest noch eine weitere MluI-Schnittstelle liegen. Durch den Nachweis des beiden Parentalhaplotypen (*u* und *lv3*) gemeinsamen MluI-Fragmentes von 150 kb auch im mutanten RTI-Haplotyp *lm2* wurde belegt, daß zwischen dem Anfang der genomischen Deletion in *lm2* und *Bat1* ebenfalls wenigstens eine weitere MluI-Schnittstelle lag. Die MluI-Fragmente, die auf die mit *Tnf α* und *Bat1* hybridisierenden Restriktionsfragmente folgen, waren mit den derzeit verfügbaren, genomischen Markern nicht zu erfassen. Die Analyse der Nicht-Klasse I-Gene *Tnf α* und *Bat1* erbrachte den Hinweis, daß die genomischen Deletionen in *RTI^{lm1}*, *RTI^{lm2}* und *RTI^{lm3}* nicht am unmittelbaren Anfang der *RTI.C/E*-Region in der Nähe dieser beiden Marker liegen.

3.1.2 Lokalisation der genomischen Deletion im *RT1*-Haplotyp *lm1*

Mit weiteren PFGE-Experimenten sollten der telomer zu *Bat1* nächstgelegene Marker, *Pou5f1*, sowie die darauf folgenden Markergene *Tcf19* und *S*, in die Analysen einbezogen werden. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden mit den Restriktionsenzymen SfiI und MluI informative Unterschiede im Hybridisierungsmuster zwischen *RT1^l* und *RT1^{lm1}* festgestellt, die eine genauere Kartierung der *lm1*-Deletion erlaubten.

Nach der Hybridisierung MluI-geschnittener DNA mit der *Pou5f1*-Sonde fiel zunächst ein deutlicher Längenunterschied zwischen den hybridisierenden Fragmenten der Haplotypen *l* und *lm1* auf, der auf die genomische Deletion in *lm1* zurückzuführen ist. Weiterhin hybridisierten in allen untersuchten Haplotypen jeweils zwei Fragmente mit der *Pou5f1*-Sonde. Da nach derzeitigem Kenntnisstand das *Pou5f1*-Gen in nur einer Kopie im Genom vorkommt, sollte demnach in der PFGE-Hybridisierung nur ein positives Fragment auftreten. Als mögliche Erklärung für die Doppelbande wurde ein unvollständiger Verdau angenommen, der vermutlich aus einer differentiellen Methylierung der betreffenden MluI-Schnittstellen, entweder auf den beiden Schwesterchromosomen oder in unterschiedlichen Zellpopulationen der zur DNA-Präparation verwendeten Gewebe² resultierte. Für die beabsichtigte Untersuchung der *lm1*-Deletion war demnach das jeweils kürzere der beiden auftretenden Fragmente das informative.

² Es wurde DNA sowohl aus Lebern, als auch aus Lymphknoten der untersuchten Rattenstämme isoliert; DNA beider Präparate zeigte die Doppelbande.

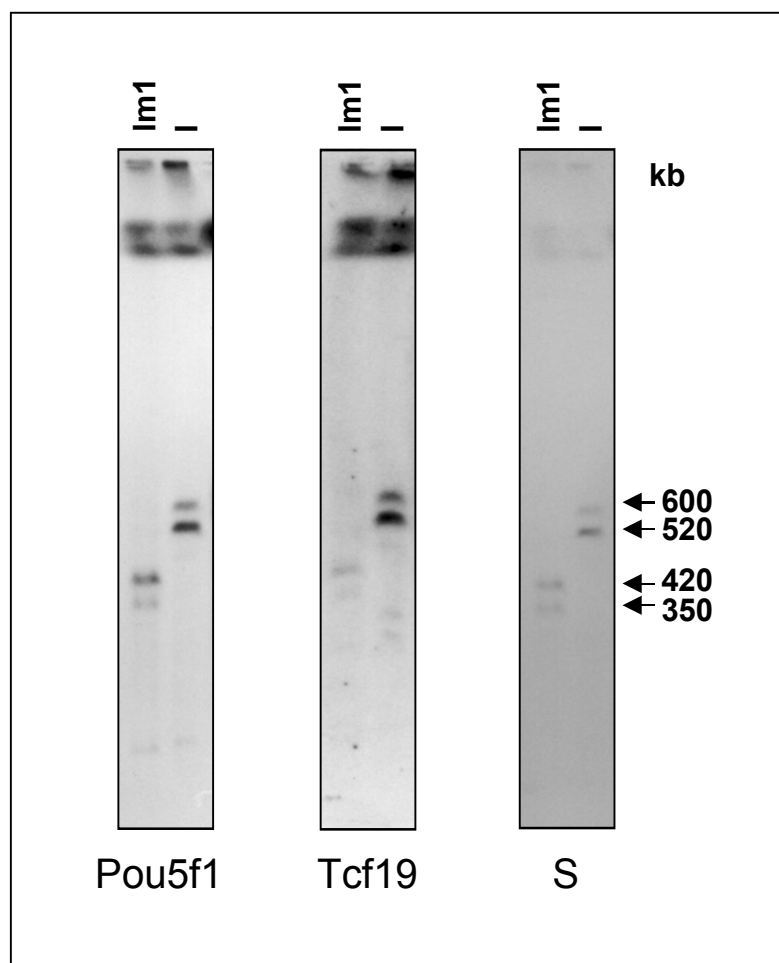


Abbildung 3-3: Gegenüberstellung der MluI-Fragmente von *l* und *lm1* nach Hybridisierung mit den Sonden Pou5f1, Tcf19 und S. In beiden Haplotypen hybridisierten die jeweils gleichen zwei Fragmente mit allen drei Sonden. Im *l*-Haplotyp lagen diese bei 600 kb und 520 kb, im Haplotyp *lm1* traten Fragmente bei 420 kb und 350 kb auf. Die Größenunterschiede der Fragmente zwischen *l* und *lm1* belegten für die genomische Deletion in *lm1* eine Größe von mindestens 170 kb (weitere Erläuterungen im Text).

Für die Richtigkeit dieser Vermutung sprach der Befund, daß bei Hybridisierung derselben Filter mit Sonden für das S-Gen und *Tcf19* die gleichen MluI-Fragmenten dargestellt werden konnten, wie mit der *Pou5f1*-Sonde. In den Haplotypen *l* und *lm3* hybridisierten die drei Sonden übereinstimmend auf gemeinsamen Fragmenten bei 600 kb und 520 kb. In *lm1* waren die entsprechenden Fragmente mit 420 kb und 350 kb deutlich kürzer als in *RT1^l*. Der Unterschied von 170 – 180 kb gegenüber *l* mußte daher auf dem Verlust eines entsprechend großen Genomabschnittes in *lm1* beruhen.

Im Haplotyp *lm3* hybridisierten mit der *Pou5f1*-Sonde Fragmente der gleichen Größe wie im *l*-Haplotyp (Abb. 3-8, Seite 54). Der in *lm3* deletierte genomische Bereich lag daher nicht innerhalb des beschriebenen 170 kb umfassenden Bereiches der *lm1*-Deletion, sondern mußte noch weiter von *Pou5f1* entfernt sein.

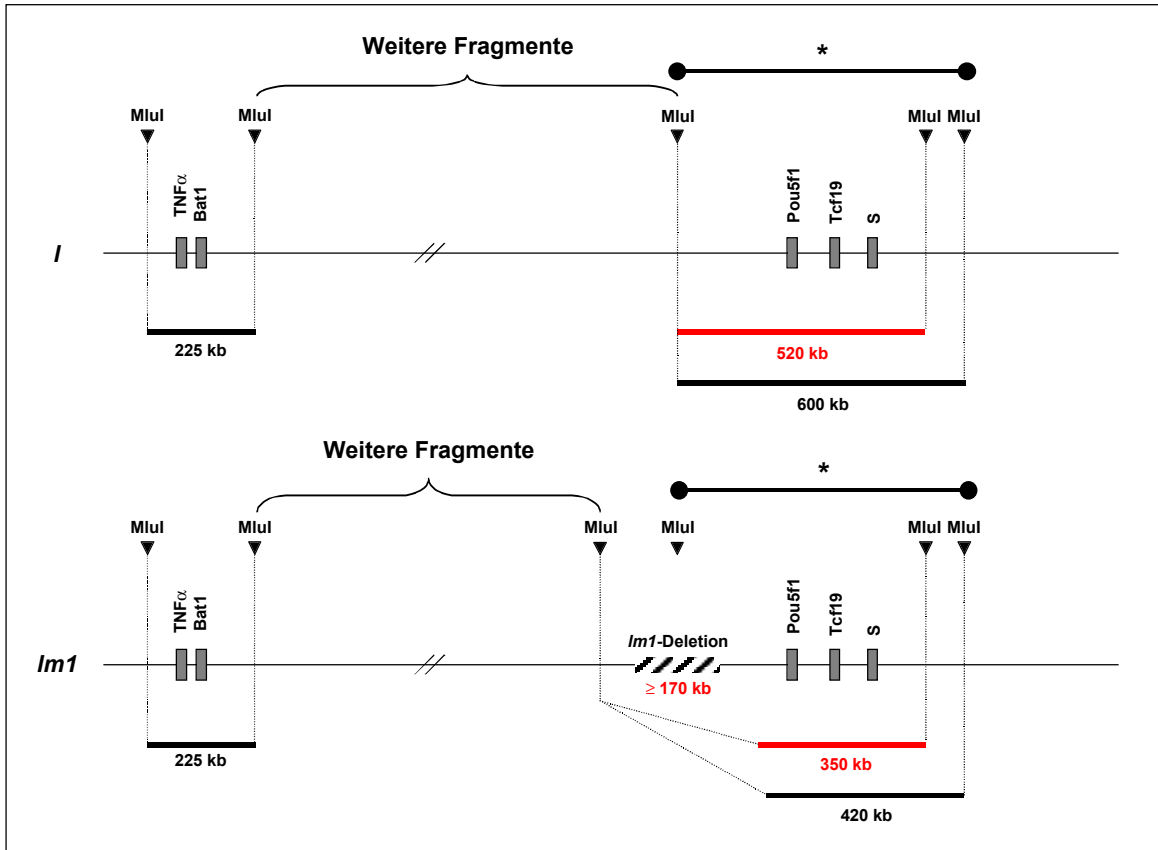


Abbildung 3-4: PFGE-Kartierung der *lm1*-Deletion in der Nachbarschaft der Gene *Pou5f1*, *Tcf19* und *S*. Schematische Darstellung der informativen MluI-Fragmente nach Hybridisierung mit Sonden für *Tnf α* , *Bat1*, *Pou5f1*, *Tcf19* und *S*. Durch die genomische Deletion in *lm1* ist die von *Pou5f1* zentromer nächstgelegene MluI-Schnittstelle verlorengegangen. Das in *lm1* mit *Pou5f1* hybridisierende, informative Fragment war um 170 kb kürzer als das entsprechende in *l*. Somit umfaßt die *lm1*-Deletion wenigstens 170 kb. Die postulierte Anordnung der MluI-Schnittstellen in dem, mit einem Stern (*) markierten Bereich stärkerer Methylierung, erfolgte aufgrund der beobachteten Größenunterschiede der hybridisierenden Fragmente. (Weitere Erläuterungen zu dem Auftreten von Doppelbanden im Text.)

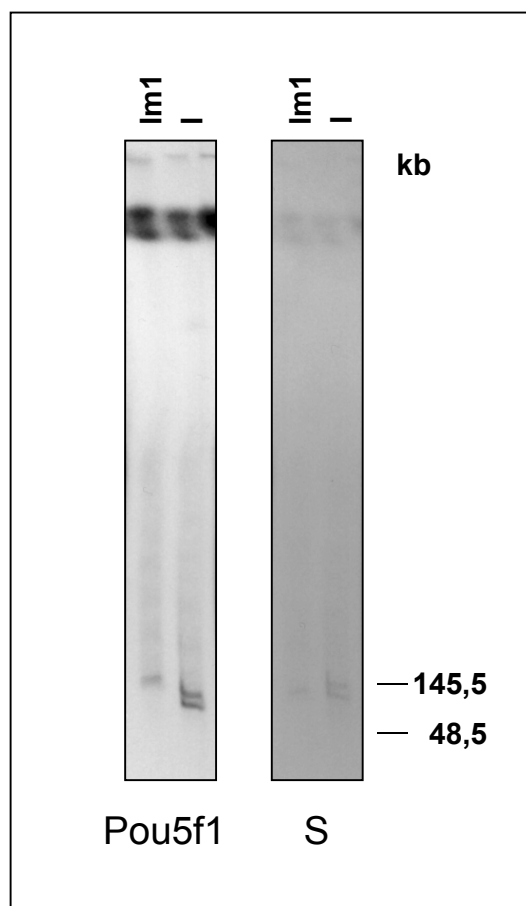


Abbildung 3-5: Gegenüberstellung der SfiI-Fragmente von *l* und *lm1* nach Hybridisierung mit den Sonden für *Pou5f1* und *S*. Die auftretenden Bandenpaare deuteten wie zuvor bei der Restriktionsendonuklease MluI auf eine partielle Verdauung der DNA hin, die wahrscheinlich auf Methylierungsunterschieden der betreffenden Schnittstellen beruhte.

Weitere Informationen zur Lage der *lm1*-Deletion gaben Hybridisierungsexperimente mit SfiI-geschnittener DNA. Mit der *Pou5f1*-Sonde traten auch hier deutliche Unterschiede im Muster der Haplotypen *lm1* einerseits und *l* und *lm3* andererseits auf (Tab. 3-2). Es hybridisierten erneut jeweils zwei unterschiedlich große Fragmente mit dieser Sonde. In *l* und *lm3* lagen sie bei 120 kb und 100 kb, bei *lm1* waren die Fragmente mit 160 kb und 140 kb um jeweils 40 kb länger. Dieser Befund zeigte, daß aufgrund der Deletion in *lm1* eine SfiI-Schnittstelle des *Pou5f1*-Fragmentes verlorengegangen und durch eine neue Schnittstelle auf der anderen Seite der Deletion ersetzt worden ist (Abb. 3-6). Die Grenze der *lm1*-Deletion befindet sich folglich auf dem 100 kb SfiI-Fragment des *l*-Haplotyps und ist maximal 100 kb von *Pou5f1* entfernt.

Tabelle 3-2: SfiI-Fragmente nach Hybridisierung mit der Oct3-Sonde für den Marker *Pou5f1*.

Fragmentlänge [kb]	Haplotyp		
	<i>l</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>
160	-	+	-
140	-	+	-
120	+	-	+
100	+	-	+

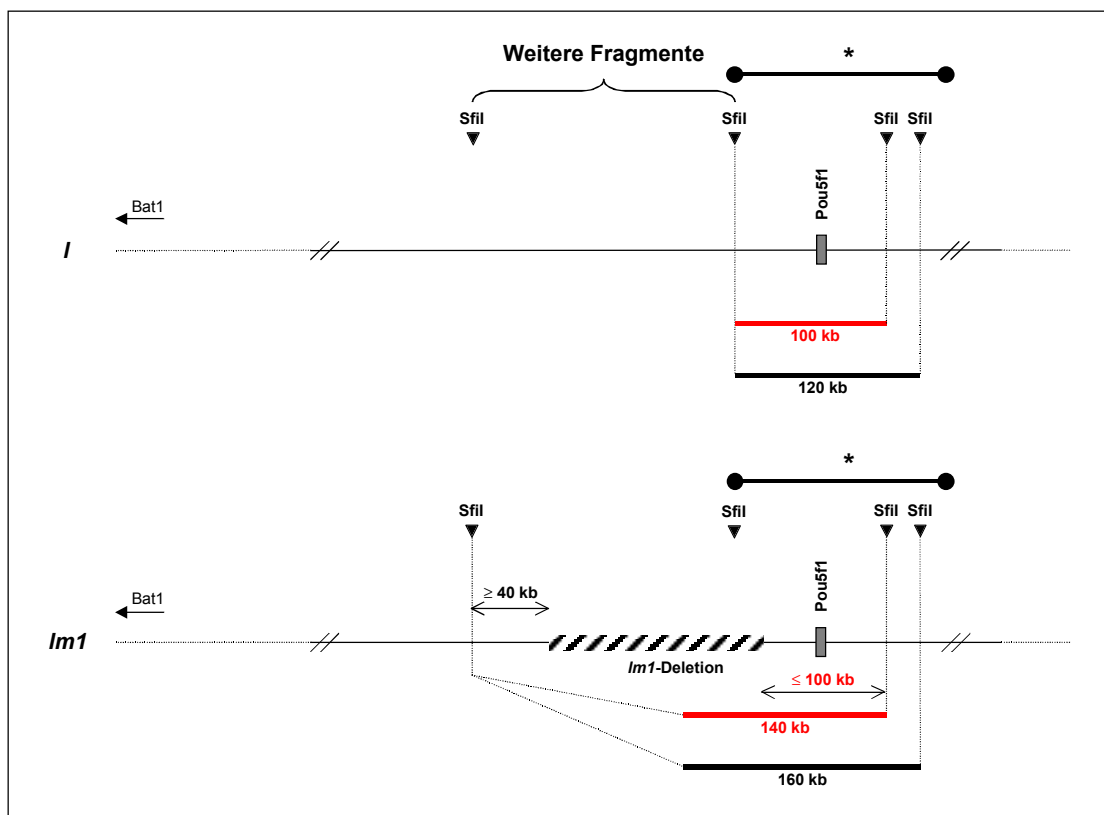


Abbildung 3-6: PFGE-Kartierung der *lm1*-Deletion innerhalb der *RT1.C/E*-Region. Schematische Darstellung der informativen SfiI-Fragmente nach Hybridisierung mit der Oct3-Sonde *Pou5f1*. Durch die Deletion ist in *lm1* eine SfiI-Schnittstelle des *Pou5f1*-Fragmentes verlorengegangen und durch eine neue Schnittstelle auf der anderen Seite der Deletion ersetzt worden. Die telomere Grenze der *lm1*-Deletion liegt folglich auf dem 100 kb SfiI-Fragment des *l*-Haplotyps und ist somit maximal 100 kb von *Pou5f1* entfernt. Die postulierte Anordnung der SfiI-Schnittstellen in dem, mit einem Stern (*) markierten Bereich stärkerer Methylierung, erfolgte aufgrund der beobachteten Größenunterschiede der hybridisierenden Fragmente.

In anschließenden Untersuchungen mit der Sonde für das *S*-Gen sollte geklärt werden, ob dieser mit *Pou5f1* auf einem gemeinsamen MluI-Fragment liegende Marker auch mit den

gleichen SfiI-Fragmenten hybridisiert. Die Sonde hybridisierte in allen drei Haplotypen mit je zwei Fragmenten bei 150 kb und 130 kb (Abb. 3-6 und nicht gezeigte Daten). Es lag somit nicht mit *Pou5f1* auf einem gemeinsamen SfiI-Fragment. Die Deletion im *lm1*-Haplotyp liegt daher auf der dem *S*-Gen entgegengesetzten Seite von *Pou5f1*. Wird für die Ratte die gleiche Abfolge der Markergene *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* postuliert, wie sie in der Maus und im Menschen gefunden wurde, kartiert die *lm1*-Deletion proximal von *Pou5f1*.

Um auszuschließen, daß die Deletionen in *lm1* und *lm3* nicht doch den distalen Bereich der *RT1.C/E*-Region mit betreffen, wurde mit der Sonde MMRI der von *S* telomer nächstgelegene Marker *Gna-rs1* untersucht.

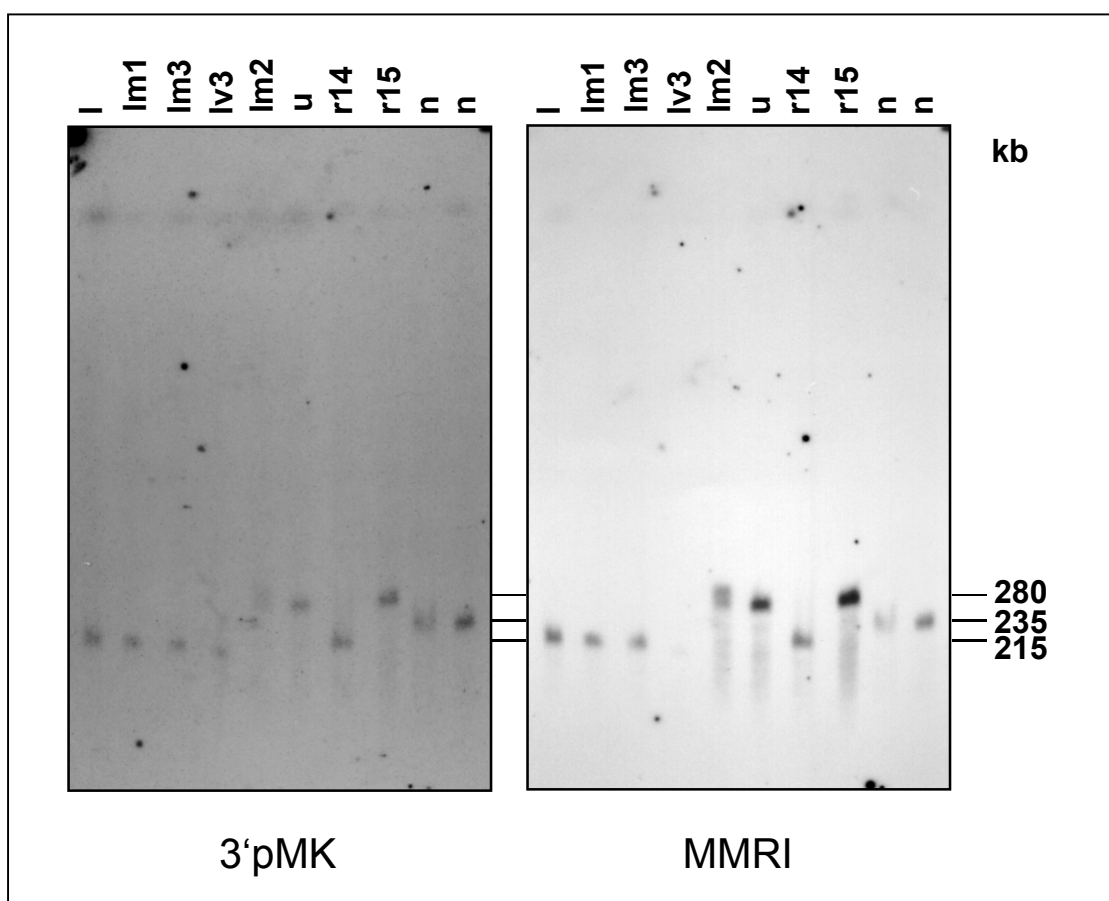


Abbildung 3-7 Darstellung der MluI-Fragmente nach Hybridisierung mit Sonden für *RT1.N* (3'pMK) und *Gna-rs1* (MMRI). Gezeigt sind Autoradiographien des gleichen Filters nach aufeinanderfolgender Hybridisierungen. Zwischen den Experimenten wurde die zuvor verwendete Hybridisierungssonde vollständig von dem Filter entfernt. Auffällig ist, daß in allen analysierten Haplotypen beide Sonden auf den jeweils gleichen polymorphen Fragmenten hybridisieren. Die Hybridisierungen geben keinen Hinweis darauf, daß die Deletionen in *lm1*, *lm2* oder *lm3* den distalen Bereich der *RT1.C/E*-Region betreffen.

Die Länge der mit MMRI hybridisierenden MluI-Fragmente variierte stark zwischen den untersuchten Stämmen. Der *u*-Haplotyp zeigte das mit 280 kb längste MluI-Fragment, in *RTI^u* trat eine Bande bei 235 kb auf, in den Haplotypen *l* und *uv3* hybridisierte ein Fragment bei 215 kb, und die Haplotypen *uv2* und *uv4* besaßen das mit 185 kb kürzeste Fragment. Die Untersuchung der mutanten Haplotypen *lm1*, *lm3* und *lm2* mit MMRI zeigte keine Unterschiede zu deren Parentalhaplotypen auf. Sowohl *lm1* als auch *lm3* besaßen die 235 kb Bande des *l*-Haplotyps, bei *lm2* hybridisierte das von *RTI^u* bekannte Fragment bei 280 kb. Die Deletionen in *lm1* und *lm3* kartierten somit eindeutig in die proximale *RTI.C/E*-Region.

Der Nachweis unterschiedlicher Fragmentlängen in den verschiedenen Haplotypen warf die Frage auf, ob sie auf einem Verlust von in diesen Bereich kartierenden Genen der *RTI.N*-Familie beruhen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der gleiche Membranfilter mit der *RTI.N*-spezifischen Sonde 3'pMK hybridisiert. Bei allen untersuchten Haplotypen ließen sich die *RTI.N*-Gene auf den gleichen MluI-Fragmente nachweisen, die zuvor mit der *MMRI*-Sonde hybridisierten. Die *RTI.N* Gene liegen also, entsprechend ihren Homologen in der Maus, in der Nähe des Markergens *MMRI* und die unterschiedlichen Fragmentlängen beruhen wahrscheinlich auf haplotypbedingten Polymorphismen der betreffenden MluI-Schnittstellen.

Nachdem die telomere Grenze der *lm1*-Deletion in die Nähe des Markergens *Pou5f1* kartiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob in *lm1* noch weitere MluI-Fragmente fehlten, oder ob der Bereich der Deletion bereits vollständig auf dem mit der Oct-3-Sonde detektierten Fragment enthalten war. Frühere Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß in unmittelbarer Nähe beider Grenzen der Deletion Klasse I Gene lokalisiert sind. Diese sollten in den folgenden PFGE-Untersuchungen mit der Klasse I Sonde pWW6.3 nachgewiesen werden, um weitere in *lm1* fehlende Fragmente darzustellen.

3.1.3 Größenbestimmung der genomischen Deletionen der *RTI*-Haplotypen *lm1* und *lm3*

Mit der pWW6.3-Sonde hybridisierten nach MluI-Verdauung im *l*-Haplotyp vierzehn Fragmente zwischen 20 kb und 600 kb (Abb. 3-8 und Tab. 3-3). Zwei davon, bei 600 kb und 520 kb, entsprachen den bereits mit den Sonden für *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* gezeigten Fragmenten (Abb. 3-3). Ein weiteres war das auch mit *Bat1* und *Tnf α* hybridisierende MluI-

Fragment bei 225 kb (Abb. 3-2). Augenfällig im Bandenmuster von *lm1* war die Reduktion der Bandenanzahl gegenüber dem Parentalhaplotyp *l*. Es fehlten, neben den bereits identifizierten MluI-Fragmenten bei 600 kb und 520 kb, drei weitere mit einer Länge von 250 kb, 80 kb und 30 kb. Die mit den Sonden für *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* im *lm1*-Haplotyp hybridisierenden MluI-Banden bei 420 kb und 350 kb fanden sich auch nach pWW6.3-Hybridisierung. Sie tragen demnach noch Klasse I Sequenzen. Die Größe der *lm1*-Deletion ergab sich anhand dieser drei fehlenden Fragmente und des Längenunterschiedes der kürzeren *Pou5f1*-Fragmente zwischen *l* und *lm1* zu insgesamt 530 kb. Damit ist der deletierte Bereich erheblich größer, als aufgrund bisheriger Schätzungen angenommen.

In *lm3* fehlte gegenüber *l* ein Fragment bei 350 kb. Dagegen traten zwei neue MluI-Fragmente von 150 kb und 120 kb Länge auf, die im Muster von *RT1^l* nicht zu finden waren. Anhand dieser fehlenden, sowie der beiden zusätzlichen Banden, läßt sich die Größe der *lm3*-Deletion rechnerisch auf 80 kb bestimmen.

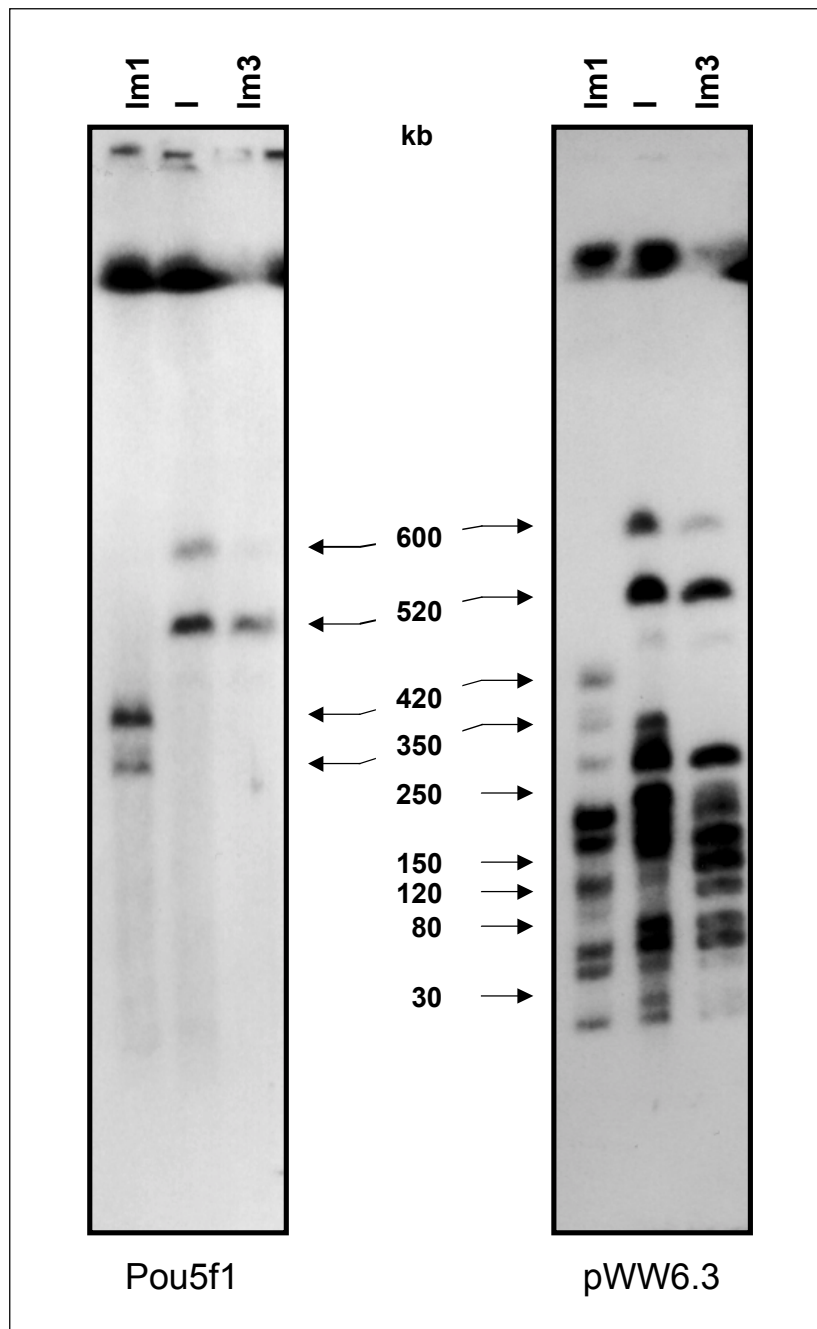


Abbildung 3-8: Gegenüberstellung der MluI-Fragmente von *l*, *lm1* und *lm3* nach Hybridisierung mit der Sonde Oct3 für *Pou5f1* bzw. pWW6.3 für den Nachweis von MHC Klasse I Genen. Deutlich ist zu erkennen, daß die *Pou5f1*-tragenden Fragmente aller drei Haplotypen auch mit der Klasse I-Sonde hybridisieren. Auf die gegenüber dem *l*-Haplotyp in den Mustern von *lm1* und *lm3* fehlenden Fragmente wird im Text eingegangen.

Tabelle 3-3: MluI-Fragmente der *RT1*-Haplotypen *l*, *lm1* und *lm3* nach Hybridisierung mit der Klasse I Sonde pWW6.3¹⁾.

Fragmentlänge [kb]	Haplotyp		
	<i>l</i>	<i>lm3</i>	<i>lm1</i>
600	+	+	-
520	+	+	-
420	-	-	+
350	+	-	+
310	+	+	+
250	+	+	-
225	+	+	+
170	+	+	+
150	-	+	-
135	+	+	+
120	-	+	-
90	+	+	+
80	+	+	-
65	+	+	+
55	+	+	+
30	+	+	-
20	+	+	+

¹⁾ vgl. Abb. 3-8

Das Fehlen des 350 kb Fragments in *lm3* schien jedoch auch noch in einer anderen Hinsicht bedeutsam. Es lieferte zusätzlich einen weiteren, indirekten Hinweis auf die Größe der Deletion in der *lm1*-Mutante. Da die *lm3*-Deletion innerhalb des bei *lm1* deletierten Bereiches liegt, muß das 350 kb Fragment auch in *lm1* fehlen. Im Hybridisierungsmuster von *lm1* war allerdings, wie oben erwähnt, ein Fragment dieser Länge vorhanden. Aus den vorangegangenen Hybridisierungen mit den Sonden für *Pou5fl*, *Tcf19* und *S* war jedoch bekannt, daß es sich hierbei um das im *lm1*-Haplotyp verkürzte Fragment handelte, das diese Marker trägt. Es besaß offenbar zufällig die gleiche Länge wie das in *lm3* fehlende Klasse I Fragment aus dem *l*-Haplotyp und nahm daher im Hybridisierungsmuster dessen Platz ein. Das Fehlen dieses 350 kb Fragmentes auch in *lm1* wurde daher nur durch den direkten Vergleich der drei Haplotypen offenbar. Bei der Berechnung der Deletionsgröße in *RT1^{lm1}* muß dieses Fragment berücksichtigt werden, womit sich schließlich für die *lm1*-Deletion eine Größe von insgesamt 880 kb ergibt.

3.2 Untersuchung der *11/3R*-Familie

Eine der MHC Klasse Ib Genfamilien der Ratte mit wenigstens 12 Mitglieder wird durch cDNA-Sonden aus dem *11/3R*-Gen definiert [78]. Da das exprimierte Klasse Ib Gen *11/3R* in dem mutanten *RT1*-Haplotyp *Im1* fehlt, stellt es einen zusätzlichen Marker für die Charakterisierung seiner Deletion innerhalb der *RT1.C/E*-Region dar. Im Rahmen der Untersuchung sollte geklärt werden, ob die Gene dieser Familie als Cluster in einem Teilssegment der *RT1.C/E*-Region lokalisiert sind oder über die gesamte Region verteilt. Damit war die Frage verbunden, ob es sich um eine wirkliche Familie handelt oder um einen in sich heterogenen Subset von Klasse I Genen.

Für die Untersuchung der *11/3R*-Genfamilie wurde eine der Besonderheiten von *11/3R* genutzt. Das Gen zeichnet sich durch einen charakteristischen und im Vergleich zu anderen Klasse I Genen besonders ausgedehnten 3' untranslatierten Bereich (3' utr) aus.

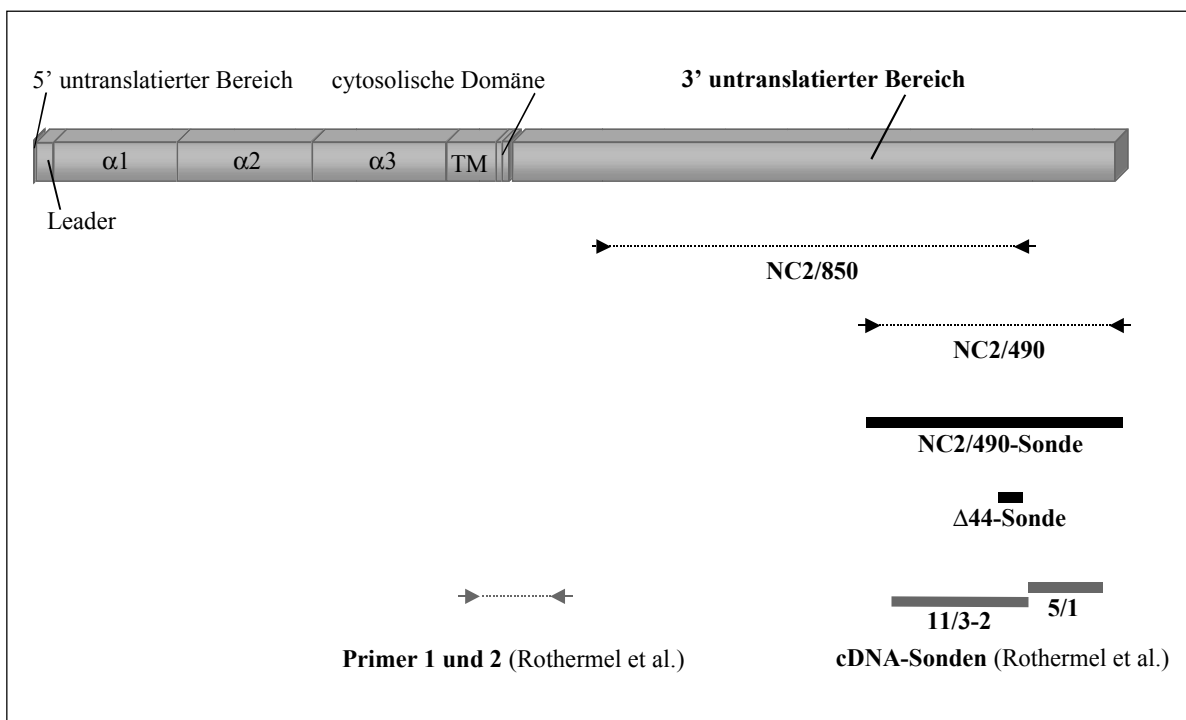


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der *11/3R*-cDNA mit den Positionen der verwendeten PCR-Primer und Hybridisierungssonden. Beide Primerpaare, NC2/490 und NC2/850, liegen in dem für *11/3R* charakteristischen 3' untranslatierten Bereich. Die NC2/490-Sonde aus *11/3R* umschließt vollständig die beiden von Rothermel et al. verwendeten cDNA-Sonden 5/1 und 11/3-2 [78]. In ihr enthalten ist schließlich auch das 44 bp-Motiv, aus dem die synthetische Oligonukleotidsonde $\Delta 44$ abgeleitet wurde.

Anhand der veröffentlichten cDNA-Sequenz³ wurden PCR-Primer zur Amplifikation verschiedener Abschnitte des gentypischen 3' utr von *11/3R* erstellt (Abb. 3-9). Das Primerpaar NC2/490 wurde so gewählt, daß aus *11/3R* ein 490 bp-Fragment amplifiziert wird, das die beiden von Rothermel und Mitarbeitern verwendeten Sonden 11/3-2 und 5/1 enthält, mit deren Hilfe die *11/3R*-Genfamilie beschrieben wurde. Das zweite Primerpaar, NC2/850, amplifiziert aus *11/3R* ein 850 bp-Fragment des 3' untranslatierten Bereiches. Es umschließt an seinem 3'-Ende gerade noch den Bereich der 11/3-2-Sonde, reicht aber in 5'-Richtung erheblich darüber hinaus. Die PCR-Produkte der Primerpaare NC2/490 und NC2/850 überlappen um etwa 350 bp.

3.2.1 Nachweis von zwei Subpopulationen der *11/3R*-Familie

Die Erstbeschreibung des *11/3R*-Gens erfolgte anhand eines cDNA-Klons aus dem *RT1^l*-Haplotyp. Es sollte daher zunächst geklärt werden, ob sich mit den gewählten PCR-Primern für den 3' untranslatierten Bereich von *11/3R* dieses Gen spezifisch in genomischer DNA dieses Haplotyps nachweisen ließ. Darüber hinaus interessierte die Haplotypverteilung des *11/3R*-Gens. Deswegen wurde mit den PCR-Primern eine Reihe weiterer *RT1*-Haplotypen untersucht.

Mit DNA der *RT1^l*-Haplotyps wurde mit den NC2/490-Primern das anhand der *11/3R*-cDNA-Sequenz erwartete Fragment von 490 bp Länge erhalten. Zusätzlich wurde ein zweites Produkt mit einer Länge von etwa 450 bp amplifiziert. Ein Fragment dieser Länge ließ sich nicht aus der *11/3R*-cDNA ableiten. Demzufolge existierte vermutlich zumindest ein weiteres, bislang nicht identifiziertes Mitglied der *11/3R*-Familie mit homologer 3'utr, aus dem dieses etwa 40 bp kürzere Fragment amplifiziert wurde. Auch aus genomischer DNA der *RT1*-Haplotypen *a*, *b*, *c*, *d*, *k* und *u*, der varianten Haplotypen *av1*, *dv1*, *lv*, *lv1*, *lv2*, *lv3* und *uv4*, sowie der rekombinanten Haplotypen *r14*, *r15*, *r36*, *wr1* und *wr2* wurden jeweils beide Produkte amplifiziert (Abb. 3-11A sowie nicht gezeigte Daten).

Es war deshalb von großem Interesse, daß bei der PCR-Analyse der mutanten Haplotypen *lm1* und *lm2* jeweils nur eines der beiden PCR-Produkte erhalten wurde. Aus DNA der *lm1*-Deletionsmutante wurde lediglich das kürzere 450 bp Produkt amplifiziert. Die Bande bei 490 bp war nicht vorhanden (Abb. 3-11A). In *lm2* wurde hingegen nur das längere 490 bp Produkt amplifiziert. Hier fehlte das kürzere Fragment bei 450 bp. Aufgrund dieser Befunde wurde

³ GenBank accession number X67504

angenommen, daß innerhalb der *RT1.C/E*-Region zwei voneinander getrennte Subpopulationen der *11/3R*-Familie existieren, die sich anhand der Fragmentlänge der NC2/490-PCR-Produkte unterscheiden lassen. In den mutanten Haplotypen *lm1* und *lm2* schien jeweils eine dieser Subpopulationen zu fehlen.

11/3R	CTACAGCTCACCTTGGAAACGCTTATGAGACTTTGCTGATCTCTGCTTCCCTGACAGAGGCCAGCTGA	1790
lm2_1	-----	68
lm2_2	-----*	67
lm1_1	-----G---C-----	68
11/3R	GAACCTCTCCTGGGGTTCTGTGGTCCCTCCAGCTGACTCCTGCCAGGCCTGGCTCTCTGCTTGG	1858
lm2_1	-----	136
lm2_2	-----	135
lm1_1	-----	136
11/3R	TGATGCCACTGTTGTTACCTGACT**AC*AACTGGACTGCTGGTGTACACGAGGTGTTTGCAGTG	1923
lm2_1	-----**-*-----CG-----	201
lm2_2	-----C--T-----CT--*-----	202
lm1_1	-----A--C-----CT--C-----C-----	204
11/3R	GGTAGAGCTGCTGCCGACCTGTGAACTGAACTGATTGCCACACAGTCCACATGTGGTCGGAAAGCTGC	1991
lm2_1	-----	269
lm2_2	-----A-A-----C-----	270
lm1_1	-----A-A-----	272
11/3R	CCTGGGCTCTCCCTGTGG*CATGCTGCTGTGGTGATTTCTGCTTCTCCTTCCTGGTGTCTTCCAGG	2058
lm2_1	-----C-----CG-----	337
lm2_2	-----A---T-A-C-----C-----CT-----	338
lm1_1	-----A-*****-----	295
11/3R	GTTCTGAGGG*TCTGGTGTGGTCTGTCTGCTCCTCTCAGGAG*ACCTCCACAGCTGAGATAAGACC	2124
lm2_1	----C---*-----C-----T-----	404
lm2_2	----C---G-----A-----C-----	406
lm1_1	----C-A-TG-----A-----A-----C-----	363
11/3R	TAACAGAGAGGCTTCTCCC*TGTAACCTGGGTACCGATTCTGAACCTGGACTGTCTTACCTTTCCG	2191
lm2_1	-----G-----	472
lm2_2	-----*-----	473
lm1_1	-----C-----	431
11/3R	TCTGGTGTCTGGAGTTAACTCCCTGAAGTCTC	2224
lm2_1	-----	490
lm2_2	-----	491
lm1_1	-----	449

Abbildung 3-10: Sequenzvergleich der NC2/490-PCR-Produkte aus genomischer DNA der Haplotypen *lm1* und *lm2* mit der cDNA-Sequenz von *11/3R*. Die aus den Mutanten stammenden Sequenzen zeigen große Übereinstimmung mit dem entsprechenden Abschnitt aus *11/3R*. Auffällig ist in der Sequenz aus *lm1* das Fehlen eines 44 bp Fragments (nt 2010-2053, rot markiert), das in den anderen Sequenzen zu finden ist. Aus diesem 44 bp-Motiv wurde für die weiteren Analysen die synthetische Oligonukleotidsonde $\Delta 44$ abgeleitet.

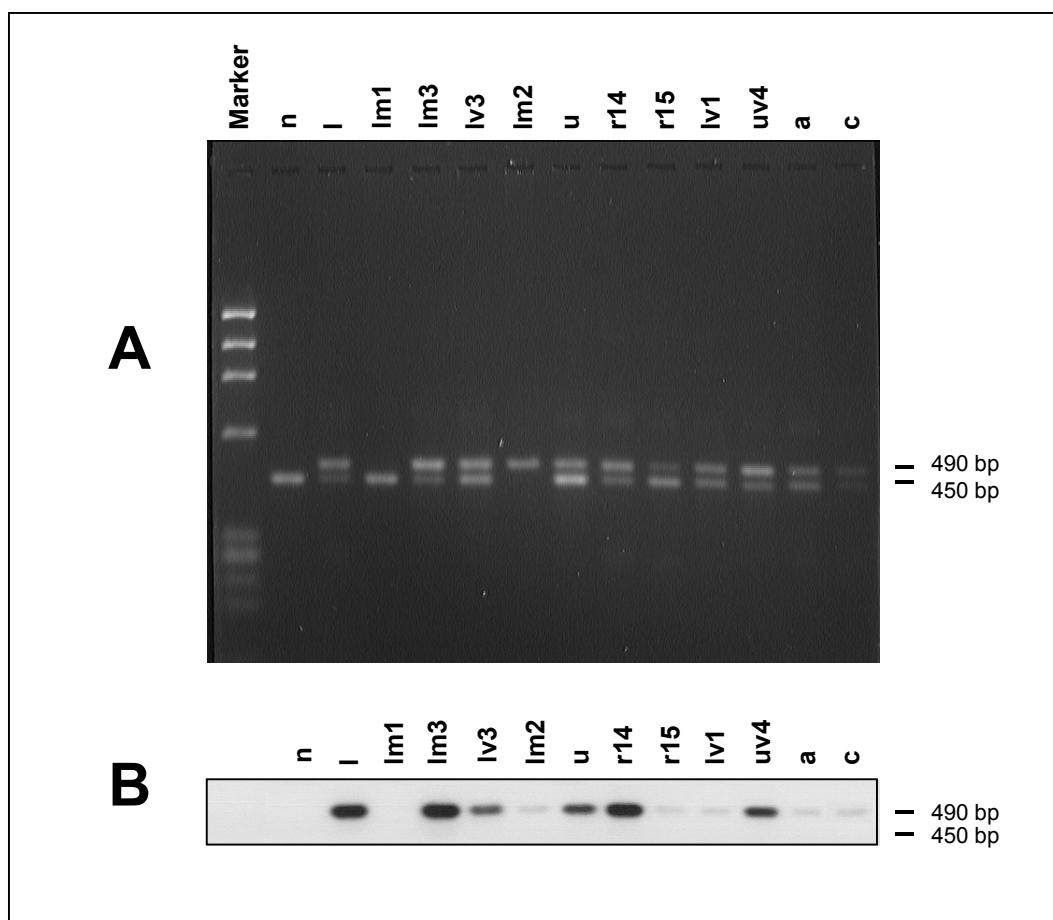


Abbildung 3-11: Nachweis zweier Subpopulationen innerhalb der *11/3R*-Familie. **A)** Bandenverteilung der NC2/490-PCR-Produkte nach Amplifikation von genomischer DNA unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen. Neben dem erwarteten 490 bp-Produkt trat bei den meisten untersuchten Haplotypen ein weiteres Fragment mit 450 bp auf. Mit *lm1*-DNA wurde nur das 450 bp-Produkt amplifiziert. DNA von *lm2* erlaubte die Amplifikation nur des 490 bp Fragmentes. Ein dritter Haplotyp, bei dem die Amplifikation nur eines Fragmentes möglich war, ist *RT1ⁿ*. Aus DNA dieses Haplotyps wurde mit den NC2/490-Primern nur das 450 bp Produkt erhalten. Eine mögliche Erklärung hierfür lag in haplotypbedingten Sequenzunterschieden, die eine Anlagerung der PCR-Primer verhinderten. **B)** Hybridisierung der NC2/490-PCR-Produkte von genomischer DNA unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen (Blot des Gels aus A) mit dem radioaktiv markierten $\Delta 44$ -Oligonukleotid. Die Sonde hybridisierte mit dem 490 bp-Fragment jedes Haplotyps. Die 450 bp Fragmente zeigten keine Hybridisierung. Die unterschiedliche Stärke der Hybridisierungssignale war auf ungleiche DNA-Mengen in den einzelnen Proben zurückzuführen.

Die Annahme zweier Subpopulationen der *11/3R*-Familie ausschließlich aufgrund der PCR-Analyse genomischer DNA warf zwei Fragen auf. Stellten die erhaltenen PCR-Produkte tatsächlich Fragmente aus den 3' untranslatierten Regionen von *11/3R*-ähnlichen Genen dar? Und wie erklärte sich der beobachtete Längenunterschied beider Fragmente?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die PCR-Produkte der Haplotypen *lm1* und *lm2* kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen stammten in der Tat alle aus den 3'-untranslatierten Bereichen *11/3R*-ähnlicher Gene (Abb. 3-10). Die Sequenzübereinstimmungen zwischen den beiden 490 bp Produkten aus *lm2* und dem entsprechenden Abschnitt der 3'-utr von *11/3R* lagen bei 99% bzw. 97%. Untereinander wiesen die beiden *lm2*-Fragmente eine Übereinstimmung von 96% auf. Die Sequenz des 450 bp Fragment aus *lm1* war ebenfalls nahezu identisch mit der veröffentlichten *11/3R* cDNA-Sequenz. Dem *lm1*-Fragment fehlte allerdings ein 44 bp Motiv, welches in den übrigen Sequenzen vorhanden war. Die dieses Motiv flankierenden Sequenzen stimmten zu 97% mit der korrespondierenden *11/3R*-Sequenz überein. Auch bei einem Vergleich mit den aus *lm2* amplifizierten Produkten wurden ähnliche Sequenzübereinstimmungen erhalten.

Das dem Produkt aus *lm1* fehlende, aber in den anderen gefundenen Fragmenten vorhandene, 44 bp-Motiv erklärte den beobachteten Längenunterschied der PCR-Produkte. Unklar war jedoch noch, ob dieses Motiv auch in den 450 bp-Fragmenten der anderen untersuchten Haplotypen fehlte. Für die Beantwortung dieser Frage wurde daher aus der Sequenz des 44 bp-Motivs ein synthetisches Oligonukleotid abgeleitet und als Hybridisierungssonde $\Delta 44$ eingesetzt. Für die Analyse wurden die mit den NC2/490-Primern erhaltenen PCR-Produkte verschiedener *RT1*-Haplotypen auf Nylonmembran transferiert und mit der $\Delta 44$ -Sonde hybridisiert (Abb. 3-11B). Keines der 450 bp PCR-Fragmente der unterschiedlichen Haplotypen hybridisierte mit der $\Delta 44$ -Sonde. Im Gegensatz dazu war in den 490 bp Banden aller untersuchten Haplotypen das $\Delta 44$ -Motiv enthalten, wie die entsprechenden Hybridisierungssignale belegten.

Anhand des 44 bp-Motivs war demnach in allen untersuchten Haplotypen eine Unterscheidung von zwei Subpopulationen der *11/3R*-Familie möglich. Aufgrund der PCR-Befunde wurde postuliert, daß durch die genomischen Deletionen der *RT1*-Haplotypen *lm1* und *lm2* die Lage jeweils einer dieser Subpopulationen markiert wird. All jene Mitglieder der *11/3R*-Familie, deren 3'-utr Sequenzen das längere PCR-Fragment ergaben, liegen in dem bei *lm1* deletierten Genomabschnitt der *RT1.C/E*-Region. Die Gene, aus denen das kürzere Fragment amplifiziert wurde, sind im Bereich der *lm2*-Deletion lokalisiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte auch mit dem zweiten Primerpaar für den 3'-untranslatierten Bereich des *11/3R*-Gens, den NC2/850-Primern, die Untersuchung

verschiedener *RT1*-Haplotypen. Aus genomischer DNA der Lewis-Ratte, wie auch der Haplotypen *lm3*, *lv3* und *lm2*, wurde nur das anhand der *11/3R*-Sequenz erwartete 850 bp-Fragment amplifiziert. In *RT1^{lm1}* und *RT1^u* trat jeweils eine zusätzliche Bande auf. Bei *lm1* war die 850 bp-Bande deutlich schwächer, und das Hauptprodukt in diesem Haplotyp bildete ein Fragment von etwa 950 bp. Bei *RT1^u* trat neben dem starken Signal bei 850 bp ein schwächeres um 1100 bp auf. Die bei *lm2* deletierte Subpopulation der *11/3R*-Familie ließ sich mit dem NC2/850-Primerpaar nicht nachweisen. Dies zeigte das Fehlen eines relativ zu dem aus *11/3R* amplifizierten um 44 bp kürzeren Produktes, wie es mit den NC2/490-Primern auftrat. Dieser Befund war unerwartet, da der mit den NC2/850-Primern amplifizierte Abschnitt von *11/3R* das $\Delta 44$ -Motiv ebenfalls beinhaltet (Abb. 3-9). Da für den 3' liegenden NC2/850-Primer die Primerbindungsstelle durch die Sequenzierungen der NC2/490-Produkte bestätigt wurde, war der Grund für das Ausbleiben der kurzen Bande bei dem 5' gelegenen NC2/850-Primer zu suchen. Vermutlich wurde dessen Anlagerung durch Sequenzunterschiede in der 3'utr der betreffenden Gene verhindert.

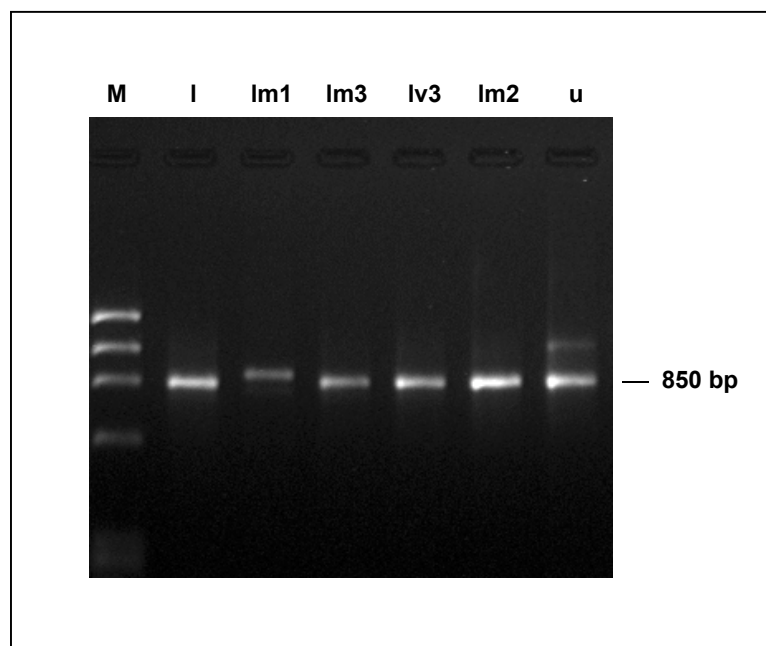


Abbildung 3-12: PCR-Produkte der NC2/850-Primer aus genomischer DNA unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen. Als Hauptprodukt wurde mit diesen Primern ein Fragment bei 850 bp erhalten. Daneben traten in den Haplotypen *lm1* und *u* zusätzliche Banden bei 950 bzw. 1100 bp auf.

Das Auftreten der zwar schwachen, aber dennoch deutlichen Bande bei 850 bp im Haplotyp *lm1* war bemerkenswert. Ein Produkt dieser Länge wurde nach den bisherigen

Befunden nur aus solchen Sequenzen erwartet, die das $\Delta 44$ -Motiv enthielten. Aufgrund der PCR-Untersuchung mit den NC2/490-Primern war jedoch postuliert worden, daß gerade diese Sequenzen im Bereich der *Im1*-Deletion liegen und daher in *Im1* fehlen sollten. Es gibt daher offenbar noch weitere *11/3R*-ähnliche Gene, die nicht mit den NC2/490-Primern reagieren und deren Lokalisation noch unklar ist. In den folgenden Experimenten sollte daher geklärt werden, in welchen Bereichen der *RT1.C/E*-Region diese Gene liegen.

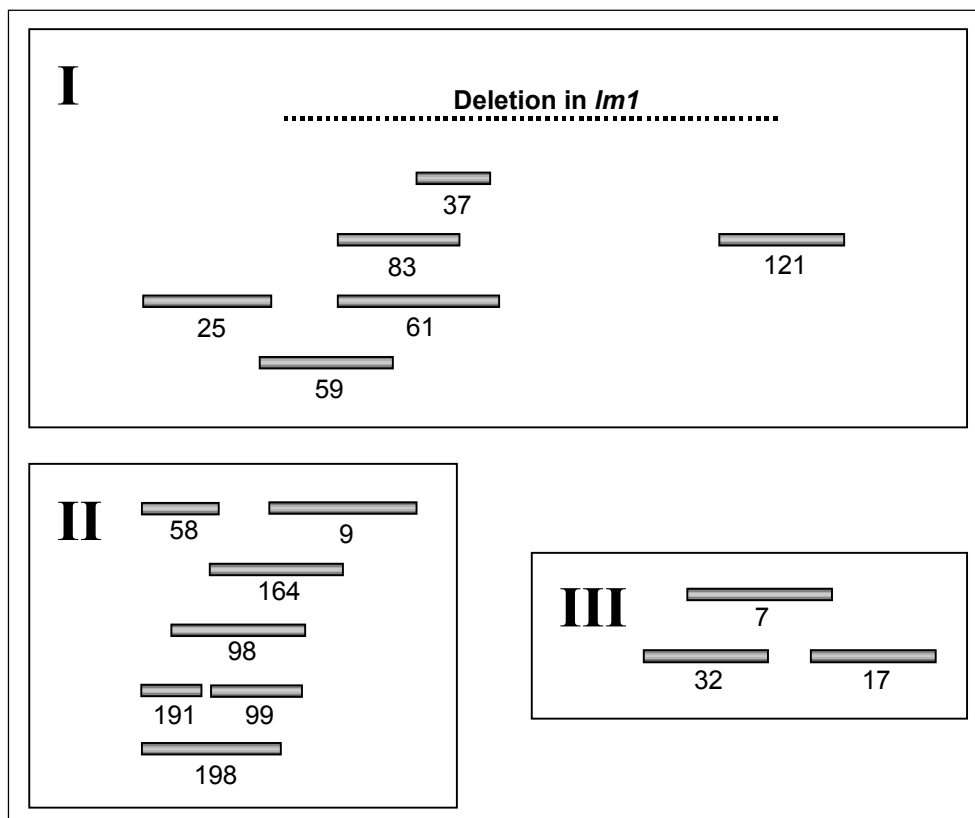


Abbildung 3-13: Cluster von Klasse I-positiven Cosmidklonen aus dem *RT1^I*-Haplotyp (nach [112]). Cluster I ist in dem Bereich der genomischen Deletion in *RT1^{Im1}* lokalisiert. Neben weiteren Klasse Ib-Genen enthält er in dem überlappenden Bereich der Cosmide 59, 61 und 83 das Gen *RT1.C^I*. Auf einem 6,5 kb *EcoRI*-Fragment von Cosmid 59 befindet sich *11/3R*. Cosmidcluster II kartiert in den telomeren Bereich der *RT1.C/E*-Region und enthält unter anderem die Klasse Ib-Gene *RT1.N*, *RT1.O* und *RT.BMI*. In Cosmidcluster III wurde das Gen für die RNA-Helikase *Bat1* lokalisiert [84]. Somit kartiert dieser Cluster an den Anfang der *RT1.C/E*-Region. (Neben den hier gezeigten Cosmiden wurden noch weitere Cosmidklone untersucht, die keinem dieser Cluster zugeordnet waren. Auf sie wird an entsprechender Stelle im Text eingegangen.)

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen zur *11/3R*-Familie waren die durch frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Cosmidklone mit Klasse I-Gensequenzen aus beiden Klasse I-Regionen der Lewis-Ratte [112]. Die Mehrzahl dieser

Cosmidklone konnte in drei unabhängige Cluster der *RTI.C/E*-Region eingeordnet werden, von denen Cluster I eindeutig in den bei *lm1* deletierten Bereich von *RTI.C/E* kartiert. Zudem war bekannt, daß das zu Cluster I zählende Cosmid 59 auf einem 6.5 kb *EcoRI*-Fragment das *11/3R*-Gen enthält. In den folgenden PCR-Experimenten sollte nun geklärt werden, ob sich auf weiteren Cosmiden Vertreter der *11/3R*-Genfamilie zeigen lassen.

Mit den NC2/490-Primern ermöglichten lediglich zwei der Cosmidklone aus Cluster I, nämlich Cosmid 59 und Cosmid 121, die Amplifikation eines Fragmentes. Bei beiden Cosmiden besaß das Produkt die erwartete Länge von 490 bp. Die übrigen Klone aus Cluster I (Cosmid 25, 83, 61 und 37) enthielten keine in diesem System amplifizierbaren Sequenzen. Auch bei der Untersuchung der Klasse I-positiven Cosmide aus Cluster II (bestehend aus den Cosmiden 58, 99, 198, 98, 164 und 9, sowie 3 und 136) und Cluster III (Cosmide 32, 7 und 17) sowie der restlichen, keinem Cluster zugeordneten Einzelklone 15 und 76, sowie Cosmid 18 aus der *A*-Region, ließen sich mit diesen Primern keine weiteren *11/3R*-ähnliche Gene nachweisen (Abb. 3-14 und nicht gezeigte Daten).

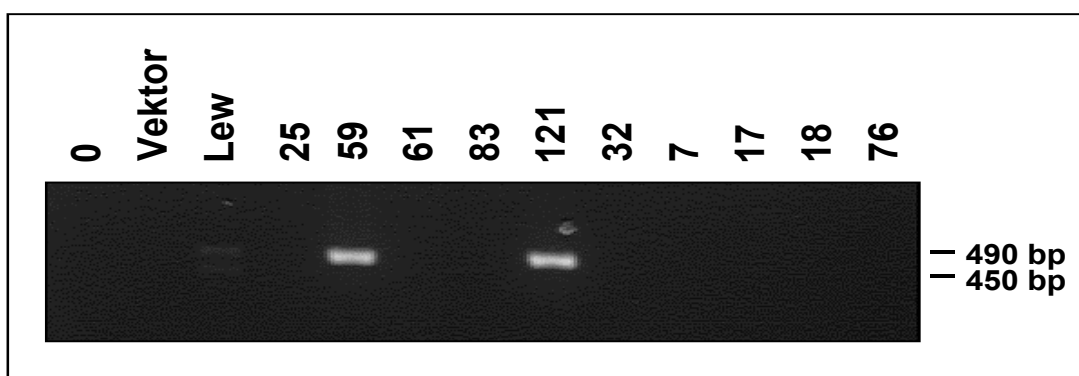


Abbildung 3-14: PCR-Produkte aus verschiedenen Cosmidklonen nach Amplifikation mit dem Primerpaar NC2/490 (Ethidiumbromidfärbung eines 2% Agarosegels). Die Cosmide 59 und 121 geben ein starkes Signal bei 490 bp, alle übrigen Cosmidklone enthalten keine amplifizierbare Sequenz. Es wurden eine Wasserkontrolle (0), eine Vektorkontrolle (pcos5EMBL) sowie als Positivkontrolle genomische DNA der LEW-Ratte mitgeführt. Die schwachen Signale der LEW-Kontrolle beruhen auf den geringen DNA-Mengen in dieser Probe.

Um einen Hinweis auf das Ausmaß der Homologie der in Cluster I nachgewiesenen *11/3R*-Gene zu erhalten, wurden die mit den NC2/490-Primern aus den Cosmiden 59 und 121 amplifizierten Fragmente sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der veröffentlichten Sequenz der *11/3R*-cDNA verglichen (Abb. 3-15).

11/3R	CTACAGCTCACCTTGAACGCTTATGAGACTTTGCTGATCTCTGCTTCCCTGACAGAGGC	1782
COS59	-----	60
COS121	-----	60
11/3R	CCAGCTGAGAACCTCTCCTGGGGTTCCTGTTGGTCCCTCCAGCTGACTCCTGCCAGGCCT	1842
COS59	-----	120
COS121	-----	120
11/3R	GGCTCTCTCTGCTTGGTGATGCCACTGTTGTTACCTGACT**ACAAACTGGACTGCTGG	1900
COS59	-----**	178
COS121	--T-----C-----C-----CT-----	180
11/3R	TGTACACGAGGTGTTTGCAAGTGGGTAGAGCTGCTGCCGACCTGTGAACTGAACTGATTG	1960
COS59	-----	238
COS121	-----	240
11/3R	CCACACAGTCCACATGTGGTCGAAAGCTGCCCTGGGCTCTCCCTGTGG*CATGCTGCTG	2019
COS59	-----*-----	297
COS121	-----A-----A-C-----	300
11/3R	TGGTGATTTCTGCTTCTCCTTCCTGGTGTCTTTC	2079
COS59	-----C-----	357
COS121	-----T-----C-----A---	360
11/3R	CTGTCTGCTCCTCTCTCAGGAG*ACCTCCACAGCTGAGATAAGACCTAACAGAGAGGCTT	2138
COS59	-----*	416
COS121	-----A-----C-----	420
11/3R	CTCCC*TGTAACCTGGGTACCGATTCCCTGAACCTGGACTGTCTTACCTTTTCCGTCTGGT	2197
COS59	-----*	475
COS121	-----C-----C-----	480
11/3R	GTTCTGGAGTTAACTCCCTGAAGTCTC	2224
COS59	-----	487
COS121	-----	492

Abbildung 3-15: Sequenzvergleich der NC2/490-PCR-Produkte aus den Cosmiden 59 und 121 mit der cDNA-Sequenz von 11/3R. Die Cosmid 59 erhaltene Sequenz stimmte bis auf eine einzige abweichende Base an Position 2064 mit der veröffentlichten 11/3R-cDNA-Sequenz überein. Die aus Cosmid 121 amplifizierte Sequenz war zu 97% mit der aus 11/3R identisch. Sie enthielt mit Ausnahme eines einzelnen Basenunterschieds das vollständige Δ44-Motiv (nt 2010–2053; rot dargestellt).

Die Sequenzierung bestätigte, daß es sich bei den Amplifikaten um die gesuchten Fragmente handelt. Das aus Cosmid 59 erhaltene Fragment besitzt eine Länge von 487 Basen und stimmt bis auf eine Abweichung mit der bekannten 11/3R-Sequenz überein. Der einzige Sequenzunterschied betrifft Position 2064 der 11/3R-cDNA. Von Rothermel und Mitarbeitern ist für diese Position ein Guanin-Rest angegeben worden. In dieser Arbeit wurde dagegen bei

allen PCR-Amplifikaten sowohl aus den Cosmiden, als auch aus genomischer DNA der Haplotypen *lm1* und *lm2*, übereinstimmend ein Cytosin-Rest an dieser Position gefunden (vgl. auch Abb. 3-10). Diese Abweichung zwischen den Sequenzen beruht daher vermutlich auf einem Sequenzierfehler.

Das Produkt aus Cosmid 121 ist mit 492 Basen etwas länger als das entsprechende Fragment aus *11/3R*. Der Sequenzvergleich zeigt 96.7 % Identität mit der veröffentlichten *11/3R*-cDNA-Sequenz bzw. 97.2 % Identität mit der aus Cosmid 59 erhaltenen Sequenz. Die Unterschiede zwischen beiden Sequenzen beruhen auf einzelnen, über den gesamten amplifizierten Bereich verteilten Nukleotidaustauschen. Das $\Delta 44$ -Motiv (nt 2010–2053) ist mit Ausnahme eines einzelnen Basenunterschieds auch in dem PCR-Fragment aus Cosmid 121 identisch enthalten.

Durch die Sequenzierungen war bestätigt worden, daß das mit den NC2/490-Primern aus Cosmid 59 erhaltene 490 bp-Fragment das gesuchte Fragment aus der 3'utr des *11/3R*-Gens ist. Dieses klonierte und aufgereinigte Fragment wurde in weiteren Experimenten zur Charakterisierung der *11/3R*-Familie als Hybridisierungssonde NC2/490 eingesetzt.

Da mit den NC2/850-Primern aus genomischer DNA neben dem erwarteten 850 bp Fragment noch weitere Produkte erhalten worden waren, stellte sich die Frage, ob sich diese in den Cosmiden ebenfalls zeigen ließen. Mit dem NC2/850-Primerpaar trat in der Tat ein anderes Reaktivitätsmuster auf als mit den NC2/490-Primern (Abb. 3-16). Die beiden Cosmide 59 und 121 aus Cluster I führten zwar auch mit den NC2/850-Primern zu der Amplifikation des erwarteten Fragmentes mit einer Länge von etwa 850 bp. In diesem System wurden jedoch zusätzlich bei weiteren Cosmiden Produkte erhalten. So tragen die Cosmide 98, 164 und 9 aus Cluster II ebenfalls Sequenzen, die ein Amplifikat der erwarteten Länge ergaben. Darüber hinaus wurde bei zwei Cosmiden aus Cluster III (32 und 7) auch ein einziges Produkt erhalten, das mit etwa 950 bp jedoch deutlich länger als das erwartete Fragment war. Ein schwaches Signal von Cosmid 15 schließlich lag bei etwa 800 bp. Alle übrigen Cosmide zeigten auch mit diesem Primerpaar kein Signal (Abb. 3-16 und nicht gezeigte Daten).

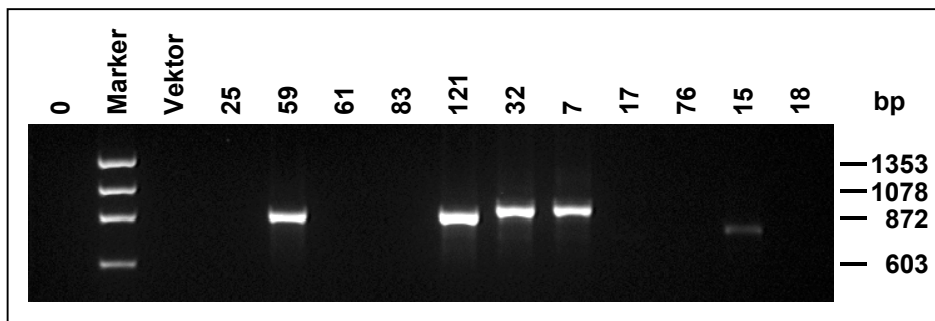


Abbildung 3-16: PCR-Produkte aus verschiedenen Cosmidklonen nach Amplifikation mit dem Primerpaar NC2/850 (Ethidiumbromidfärbung eines 1.5% Agarosegels). Die Cosmide 59 und 121 aus Cluster I geben ein PCR-Signal bei der erwarteten Länge von 850 bp. Zusätzlich tritt bei den Cosmiden 32 und 7 ein Produkt bei 950 bp und bei Cosmid 15 eines bei 800 bp auf. Es wurden eine Wasserkontrolle (0) und eine Vektorkontrolle (pcos5EMBL) mitgeführt.

Die unterschiedliche Länge der mit den NC2/850-Primern erhaltenen Produkte warf die Frage auf, ob die betreffenden Cosmidklone wirklich *11/3R*-ähnliche Klasse I Gene tragen, oder ob lediglich eine zufällige Primerbindung zu den Signalen geführt hatte. Durch Hybridisierung geschnittener Cosmid-DNA mit der NC2/490-Sonde sollte daher den Fragen nachgegangen werden, ob die in der PCR auf den Cosmiden nachgewiesenen *11/3R*-homologen Sequenzen auch in der Hybridisierung gezeigt werden können, und ob die hierbei auftretenden Banden mit bereits bekannten Klasse I positiven Fragmenten übereinstimmen.

Die hierfür zunächst vorgenommene Hybridisierung von EcoRI-geschnittener Cosmid-DNA mit der Klasse I-Sonde pWW6.3 bestätigte die aus früheren Arbeiten bekannten Fragmente bei allen untersuchten Cosmiden [112]. Die anschließende Hybridisierung des gleichen Filters mit der *11/3R*-Sonde NC2/490 zeigte, daß mit dieser nur ein kleiner Teil der Klasse I-positiven Klone hybridisierte. Die Mehrzahl der Cosmide gab mit dieser Sonde überhaupt kein Signal (17, 83 sowie alle Cosmide aus Cluster II (nicht gezeigt)). Die im vorangegangenen Abschnitt für einige der Cosmide aus Cluster II beschriebenen PCR-Signale sind daher sehr wahrscheinlich auf unspezifische Primerbindung zurückzuführen. Die wenigen Hybridisierungssignale der restlichen Cosmide wiesen sehr unterschiedliche Intensitäten auf. Nur sehr schwach hybridisierte ein 1.6 kb Fragment des *A*-Region Cosmids 18. Bei dem keinem Cluster zugeordneten Cosmid 15 traten zwei unterschiedlich stark hybridisierende Fragmente auf; ein Signal bei 12 kb war sehr schwach und das bei 6.8 kb gehörte zu den mäßig starken. Bei dem aus Cluster III stammenden Cosmid 7 hybridisierte eine 15 kb Bande

ebenfalls nur moderat mit der NC2/490-Sonde. Besonders starke Signale gaben, neben dem *I1/3R* tragenden 6.5 kb Fragment von Cosmid 59, die auch aus Cluster I stammenden Cosmide 25 und 121. Insgesamt wurden bei den untersuchten Cosmiden acht verschiedene EcoRI-Fragmente von der NC2/490-Sonde erkannt, von denen die Hälfte auf den zu Cluster I zählenden Cosmiden 25, 59 und 121 zu finden war (Abb. 3-17 und Tab. 3-4).

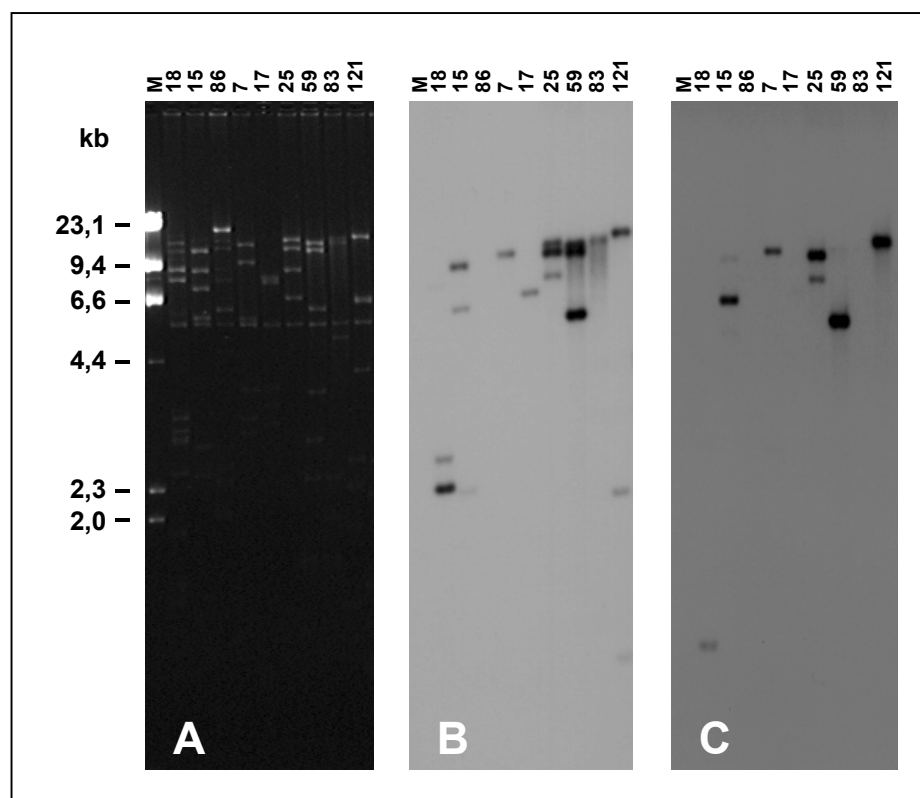


Abbildung 3-17: Nachweis unterschiedlicher Klasse I-Sequenzen in verschiedenen Cosmidklonen. Die Cosmid-DNA verschiedener Klone wurde mit EcoRI geschnitten und über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Die Ethidiumbromidfärbung (A) zeigt die erhaltenen Restriktionsfragmente. Die DNA wurde auf Nylonmembran transferiert und mit der allgemeinen Klasse I-Sonde pWW6.3 (B) sowie mit der NC2/490-Sonde (C) hybridisiert. Die hybridisierten Filter wurden final jeweils mit $2\times$ SSC/0.1% SDS bei 68°C gewaschen. Als Negativ-Kontrolle der Hybridisierungen wurde das Cosmid 86 mitgeführt, das keine Klasse I Sequenzen enthielt. Es hybridisierte weder mit der pWW6.3- noch mit der NC2/490-Sonde. (Weitere Erläuterungen im Text.)

Die mit NC2/490 beobachteten Fragmente hybridisierten auch mit pWW6.3. Die einzige Ausnahme stellte hierbei die 1.6 kb EcoRI-Bande von Cosmid 18 dar. Diese hybridisierte lediglich mit NC2/490, nicht aber mit pWW6.3. Eine Erklärung für das Auftreten dieser Bande lag in einer möglichen, internen EcoRI-Schnittstelle des betreffenden Gens auf Cosmid 18. Da die pWW6.3-Sonde bei MHC Klasse I Sequenzen an den 5' Bereich bis einschließlich Exon 3 bindet, die NC2/490-Bindungssequenz hingegen im 3' untranslatierten

Bereich liegt, würden beim Vorliegen einer internen Schnittstelle in einem Klasse I Gen von beiden Sonden unterschiedliche Fragmente erkannt werden. In Anbetracht des sehr schwachen Hybridisierungssignals mit der NC2/490-Sonde kommt jedoch auch eine unspezifische Kreuzhybridisierung mit Cosmid 18 als Ursache für diese nicht mit pWW6.3 hybridisierende Bande in Betracht. Die übrigen, mit beiden Sonden hybridisierenden EcoRI-Fragmente, repräsentieren jedoch eindeutig Klasse I Gene mit homologen Sequenzen zur 3'utr von *II/3R*.

Tabelle 3-4: EcoRI-Fragmente verschiedener Klasse I-positiver Cosmidklone nach Hybridisierung mit den *II/3R*-Sonden NC2/490 und $\Delta 44$, sowie der allgemeinen Klasse I-Sonde pWW6.3.

Cosmid	EcoRI-Fragment	NC2/490	$\Delta 44$	pWW6.3
121	19	+	+	+
	2,8	-	-	+
	1,5	-	-	+
83	18	-	-	+
	17	-	-	+
59	12,5	-	-	+
	6,5	+	+	+
	18	-	-	+
25	15	+	-	+
	9,1	+	-	+
	15	+	+	+
7	15	+	+	+
17	7,9	-	-	+
18	3,2	-	-	+
	2,85	-	-	+
	1,6	+	-	-
15	12	+	-	+
	6,8	+	+	+
	2,8	-	-	+

Mit Ausnahme der 1,6 kb Bande von Cosmid 18 hybridisieren die mit NC2/490 gezeigten Fragmente auch mit pWW6.3. Sie repräsentieren vollständige Klasse I-Gene oder Genfragmente. Nur ein Teil der mit NC2/490 nachgewiesenen Fragmente hybridisierte auch mit der $\Delta 44$ -Sonde (vgl. Abb. 3-19).

Um die verschiedenen Hybridisierungssignale mit der NC2/490-Sonde weiter zu charakterisieren, wurde ein neues Hybridisierungsexperiment mit vier identischen Cosmidfiltern durchgeführt. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die einzelnen Filter mit verschiedener Stringenz gewaschen. Hierdurch konnte eine Differenzierung unterschiedlich stark hybridisierender Fragmente vorgenommen werden.

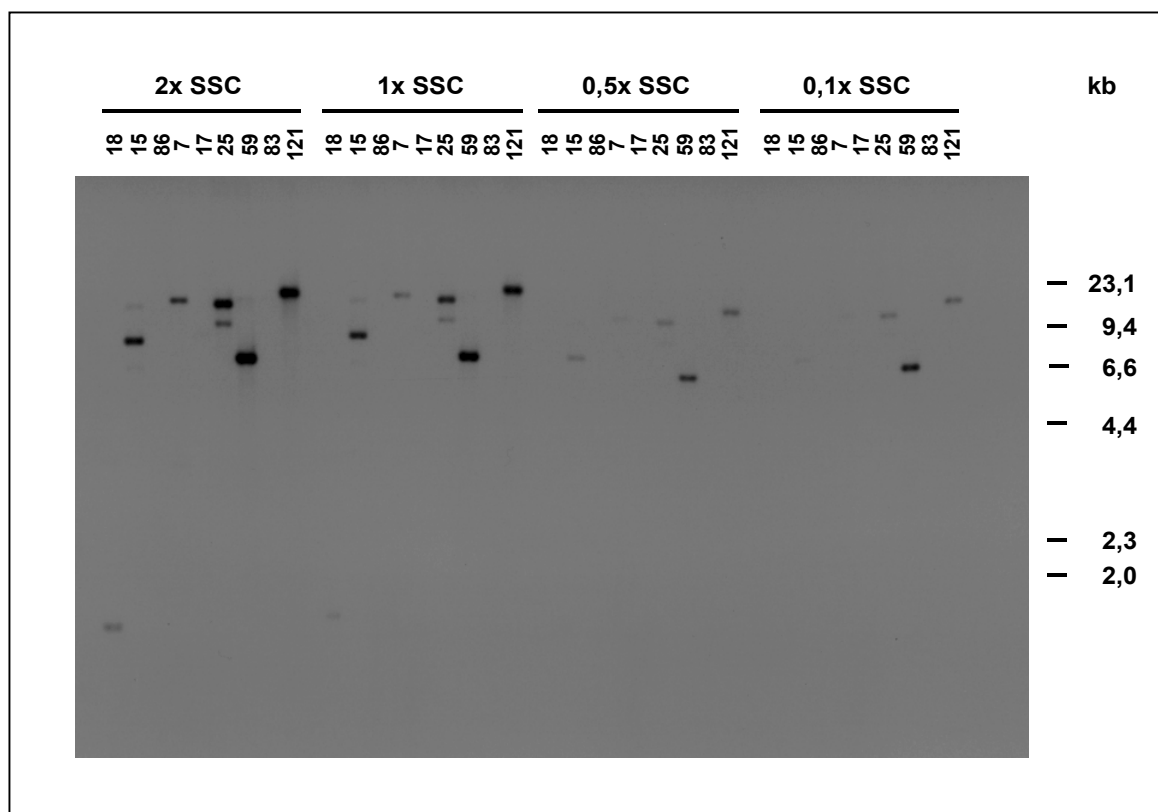


Abbildung 3-18: Hybridisierung verschiedener Klasse I-positiver Cosmidklone mit der NC2/490-Sonde. Von EcoRI-geschnittener Cosmid-DNA wurden vier identische Blots angefertigt und diese gemeinsam hybridisiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Membranen mit ansteigender Stringenz (2x SSC/0.1% SDS, 1x SSC/0.1% SDS, 0.5x SSC/0.1% SDS und 0.1x SSC/0.1% SDS), wobei jeweils eine Membran vor dem Wechsel zur nächsten Stringenz aus der Waschlösung genommen wurde. Die Membranen wurden nebeneinander auf Filterpapier fixiert und gemeinsam für 4 h autoradiographiert.

Wie Abbildung 3-18 zeigt, nahm mit steigender Stringenz der Waschschrte die Anzahl der mit NC2/490 hybridisierenden Fragmente erwartungsgemäß deutlich ab. Unter niedrig stringenten Bedingungen gaben bei den untersuchten Cosmiden alle oben beschriebenen acht Fragmente ein Signal. Nach Verringerung der Salzkonzentration in der Waschlösung auf 1x SSC war das schwache Hybridisierungssignal von Cosmid 18 nicht mehr nachweisbar, während alle anderen Signale zwar abgeschwächt, aber noch klar erkennbar waren. Dies stützte die Annahme, daß das Signal von Cosmid 18 lediglich Ergebnis einer unspezifischen Hybridisierung war. Die nächste Stringenzerhöhung auf 0.5x SSC führte zu dem Ausbleiben von weiteren drei Signalen. Die 15 kb-Bande aus Cosmid 7 war nicht mehr nachweisbar, ebensowenig die jeweils schwächer hybridisierenden Fragmente der Cosmide 15 (12 kb) und 25 (9,1 kb).

Tabelle 3-5: Relative Signalintensitäten der Cosmidfragmente nach Hybridisierung mit NC2/490 und Waschen der Filter mit ansteigender Stringenz.

Cosmid- Klon	EcoRI- Fragment [kb]	2× SSC / 0,1% SDS	1× SSC / 0.1% SDS	0.5× SSC / 0.1% SDS	0.1× SSC / 0.1% SDS
59	6,5	++++	++++	+++	++
121	19	++++	+++	++	+
25	15	++++	+++	++	+
	9,1	+	+/-	-	-
7	15	+	+/-	-	-
15	12	+	+/-	-	-
	6,8	+++	++	+/-	-
18	1,6	+/-	-	-	-

Die stärksten Hybridisierungsintensitäten gaben Cosmide aus dem Bereich der *lm1*-Deletion (Cluster I). Alle nicht in diesen Bereich kartierenden Cosmide zeigten schwächere Hybridisierungssignale (in der Tabelle steht +++++ für ein sehr starkes, + für ein schwaches, aber noch deutliches Signal und +/- für ein sehr schwaches Signal).

Nach weiterer Verringerung der Salzkonzentration auf 0.1× SSC gaben nur noch die Cosmide 59, 121 und 25 ein Signal. Jedes dieser drei Cosmide kartiert in den Bereich der genomischen Deletion in *RT1^{lm1}*. Damit war dies ein deutlicher Hinweis darauf, daß in diesem Abschnitt der *RT1.C*-Region neben *11/3R* und dem auf Cosmid 121 liegenden Gen noch zumindest ein weiteres Mitglied der *11/3R*-Familie lokalisiert ist. Für dieses, auf dem 15 kb EcoRI-Fragment von Cosmid 25 liegende Klasse Ib Gen, kann aufgrund der mit Cosmid 121 vergleichbaren Signalintensität in der Hybridisierung postuliert werden, daß es auch eine ähnlich hohe Homologie zu *11/3R* besitzt.

Für die Lokalisation der Mitglieder der *11/3R*-Familie bedeuten die vorgestellten Befunde, daß eine Gruppe von wenigstens drei Genen mit hoher Sequenzhomologie zu der 3'utr von *11/3R* in dem Bereich der *lm1*-Deletion liegt. Zumindest drei weitere Gene oder Genfragmente mit geringerer Homologie zu *11/3R* befinden sich auf Cosmiden, die in den unmittelbaren Anfangsbereich der *RT1.C/E*-Region kartieren. Auf die Existenz von *11/3R*-Genen im telomeren Teil der *C/E*-Region gibt es keinerlei Hinweise, da sich alle bisher untersuchten Cosmide dieser Bereiche sich als mit der NC2/490-Sonde negativ erwiesen.

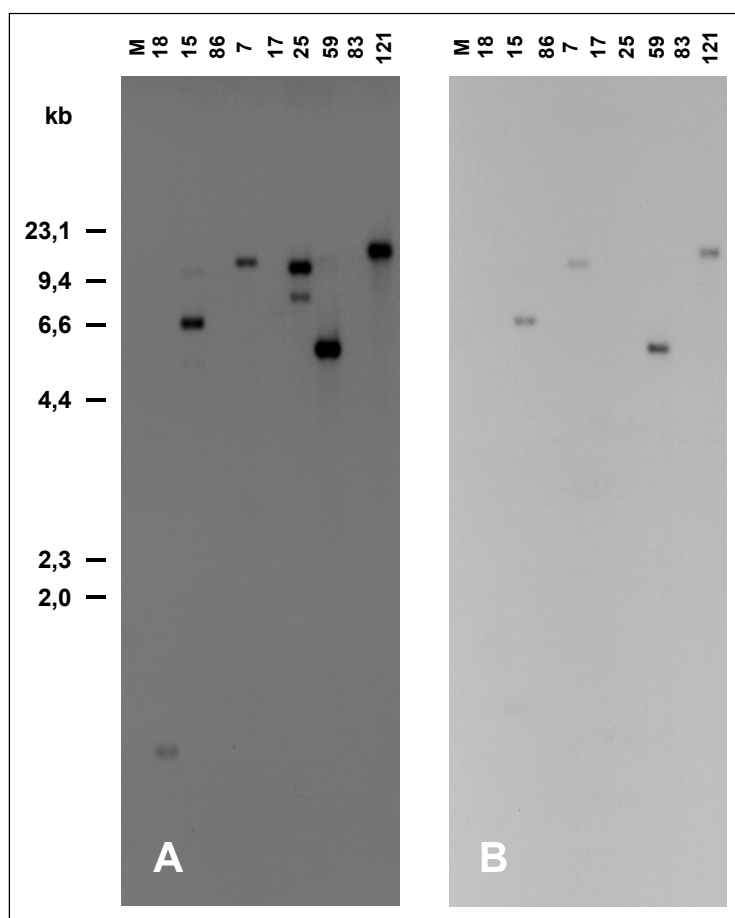


Abbildung 3-19: Gegenüberstellung der EcoRI-Fragmente verschiedener Cosmidklone nach Hybridisierung mit NC2/490 (A) und $\Delta 44$ (B). Gezeigt sind die Autoradiographien nach aufeinanderfolgender Hybridisierung des gleichen Filters. Zwischen den Hybridisierungen wurde die vorangegangene Hybridisierungssonde vollständig entfernt. Von den acht NC2/490 positiven Fragmenten hybridisierten vier auch mit der $\Delta 44$ -Sonde.

Abschließend wurden die Cosmidklone auf ihre Reaktivität mit der $\Delta 44$ -Sonde überprüft. Nach EcoRI-Verdauung zeigte erwartungsgemäß erneut das 6,5 kb *11/3R*-Fragment von Cosmid 59 das stärkste Hybridisierungssignal, gefolgt von dem 19 kb EcoRI-Fragment des Cosmids 121. Es hybridisierten jedoch noch zwei weitere Banden mit der $\Delta 44$ -Sonde: ein EcoRI-Fragment von Cosmid 15 bei 6,8 kb und eines von Cosmid 7 bei 15 kb zeigten ebenfalls deutliche Signale (Abb. 3-19). Dieser Befund belegte, daß am unmittelbaren Anfang von *RT1.C/E* ebenfalls *11/3R*-ähnliche Gene liegen, die das $\Delta 44$ -Motiv tragen.

3.2.2 Nachweis *11/3R*-homologer Gene in verschiedenen *RT1*-Haplotypen

Durch die PCR-Analyse wurde in einer Reihe von *RT1*-Haplotypen Gene der *11/3R*-Familie gezeigt. Für den *l*-Haplotyp wurden darüber hinaus auf Cosmiden aus dem Anfangsbereich der *RT1.C/E*-Region sieben Klasse I Gene der *11/3R*-Familie nachgewiesen. Die Frage nach der Gesamtzahl der *11/3R*-Gene in den verschiedenen Haplotypen konnte jedoch nicht beantwortet werden. Um hierüber Klarheit zu erlangen, erfolgten RFLP-Analysen genomischer DNA unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen mit der allgemeinen Klasse I Sonde pWW6.3 und mit der NC2/490-Sonde für den Nachweis *11/3R*-ähnlicher Gene.

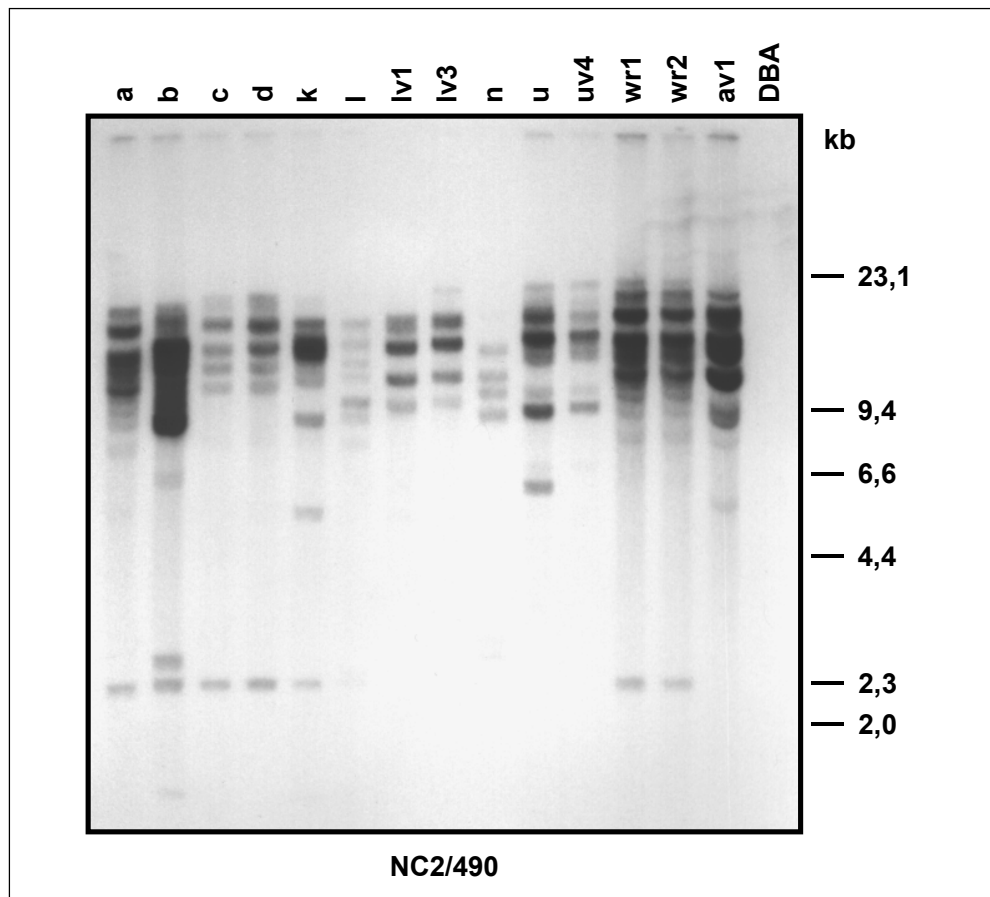


Abbildung 3-20: RFLP-Analyse EcoRI-geschnittener DNA unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen mit der NC2/490-Sonde. (Der Filter wurde final mit 0.1× SSC/0.1% SDS bei 68°C gewaschen.) In allen untersuchten Haplotypen waren Mitglieder der *11/3R*-Familie nachweisbar. Auffällig in den sehr polymorphen Mustern waren einzelne Banden, die mehreren Haplotypen gemeinsam waren (z.B. ein 2.7 kb EcoRI-Fragment in *RT1ⁿ*, ein 2.4 kb Fragment im *l*-Haplotyp oder ein Fragment bei 1.3 kb aus *RT1^k*). Die unterschiedlichen Hybridisierungsintensitäten beruhen auf unterschiedlichen DNA-Mengen in den Proben. Murine DNA der DBA-Maus (*H-2^d*, äußerste rechte Spur) hybridisierte nicht mit der NC2/490-Sonde.

In allen untersuchten Haplotypen waren mit der NC2/490-Sonde mehrere Fragmente nachweisbar. Ihre Anzahl variierte zwischen den einzelnen Haplotypen in einem Bereich von 7 Fragmenten in F344 ($RTI^{h/l}$) und 8 in LEW.1N (RTI^n), über 13 Fragmente in den Stämmen LEW.1A (RTI^a) und LEW.1K (RTI^k) bis hin zu 17 Fragmenten in LEW (RTI^l) und 18 in LEW.1U (RTI^u). Die Analyse der *a/u*-rekombinanten Haplotypen *wr1* und *wr2* lieferte weitere Indizien für die Lokalisation der *I1/3R*-Familie innerhalb der *RTI.C/E*-Region. Beide Haplotypen zeigten nach Hybridisierung mit NC2/490 mit Ausnahme eines einzigen RTI^u -spezifischen EcoRI-Fragmentes bei 26 kb ausschließlich das Muster des *a*-Haplotyps. Die betreffenden Gene lagen demnach nahezu alle innerhalb der *RTI.C/E*-Region. Auffällig waren weiterhin die identischen Fragmentmuster der Haplotypen *c* und *d* nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde, die auf eine nahe Verwandtschaft der *I1/3R*-Familien beider Haplotypen hindeuteten.

Eine mitgeführte Probe muriner DNA der DBA-Maus ($H-2^d$) enthielt keine Sequenzen, die unter den verwendeten stringenten Bedingungen mit der NC2/490-Sonde hybridisierten.

Die mit NC2/490 hybridisierenden Fragmente waren bis auf wenige Ausnahmen ebenfalls mit der pWW6.3-Sonde darstellbar. Die nicht Klasse I positiven Fragmente traten vornehmlich in dem Längenbereich kleiner 5 kb auf (bei 1.6 kb in RTI^b , bei 2.5 kb in RTI^b und RTI^n , bei 1.3 kb und 4.4 kb in RTI^k oder ein in den Haplotypen *a*, *b*, *c*, *d*, *k* und *l* auftretendes Fragment bei 2.3 kb). Der Anteil der *I1/3R*-positiven Fragmente an der Gesamtheit der durch pWW6.3 nachweisbaren Klasse I Gene lag in den untersuchten Stämmen etwa um 50 %. Es gab eine Reihe von haplotypspezifischen Banden, wie z.B. ein 2.7 kb EcoRI-Fragment in RTI^n oder ein 2.4 kb Fragment im *l*-Haplotyp. Einige Fragmente traten jedoch in verschiedenen Haplotypen auf. Beispiele hierfür sind das nicht mit pWW6.3 reaktive EcoRI-Fragment bei 2.3 kb in den Haplotypen *a*, *b*, *c*, *d*, *k* und *l* oder das in allen untersuchten Haplotypen gefundene Klasse I positive EcoRI-Fragment bei 16 kb.

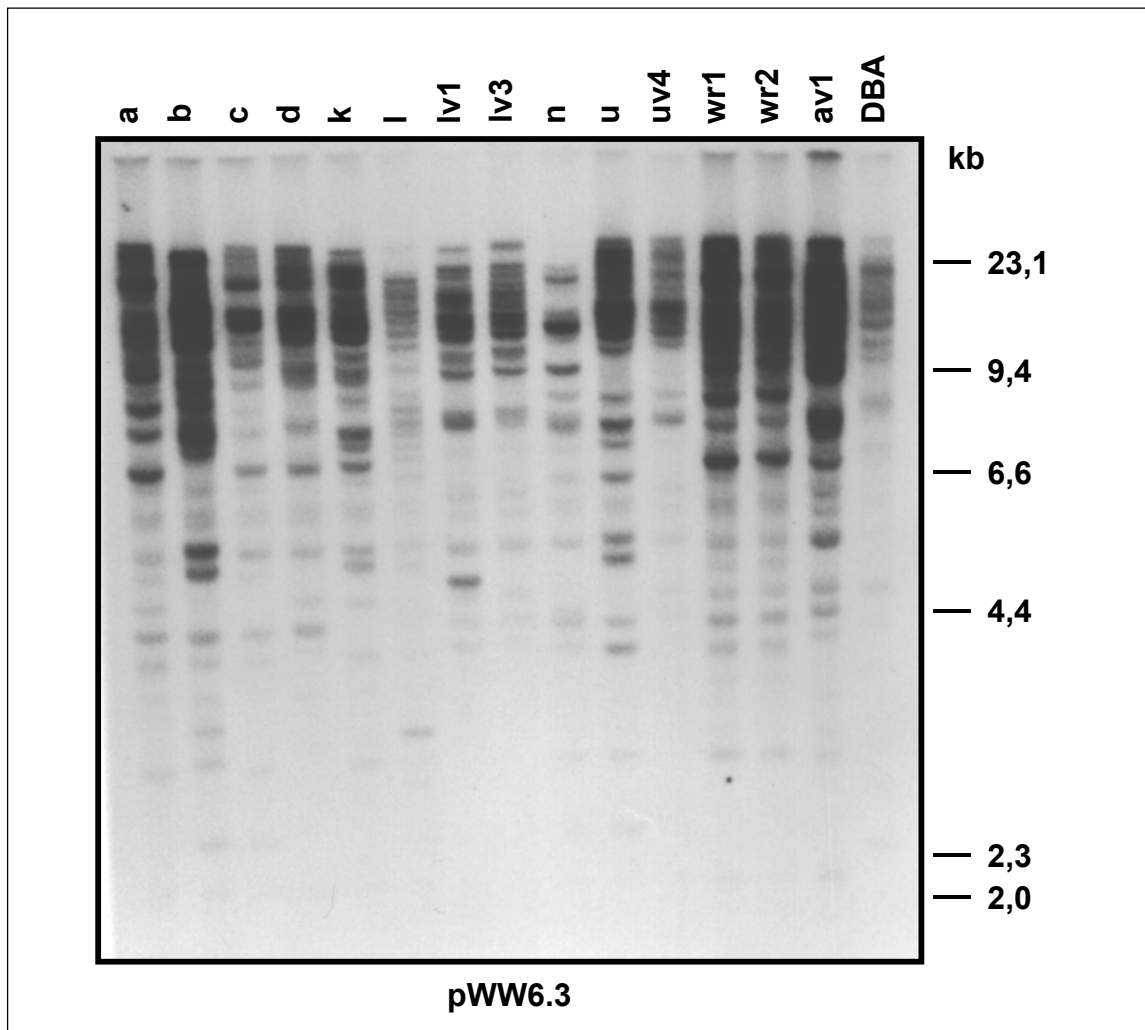


Abbildung 3-21: RFLP-Analyse EcoRI-geschnittener DNA unterschiedlicher *RTI*-Haplotypen mit der pWW6.3-Sonde. (Der Filter wurde final mit $0.1\times$ SSC/0.1% SDS bei 68°C gewaschen.) Mit pWW6.3 hybridisierten deutlich mehr Fragmente als zuvor mit der NC2/490-Sonde. Die unterschiedlichen Hybridisierungsintensitäten beruhten wiederum auf unterschiedlichen DNA-Mengen in den Proben. Im Gegensatz zur NC2/490-Sonde hybridisierte die pWW6.3-Sonde in muriner DBA-DNA ($H-2^d$, äußerste rechte Spur) deutlich und mit mehreren Fragmenten.

Mit der NC2/490-Sonde wurden, wie gezeigt, auch in den RFLP-Analysen in allen untersuchten Haplotypen *11/3R*-ähnliche Gene nachgewiesen. Die überwiegende Mehrzahl der hierbei gezeigten Fragmente war ebenfalls mit pWW6.3 reaktiv. Somit stellen die *11/3R*-ähnlichen Gene eine umfangreiche Familie von Klasse I Genen in der Ratte dar. Es gab neben einigen Banden, die in einer Reihe von Haplotypen vorhanden waren und die für eine Konservierung der entsprechenden Sequenzen sprechen, auch haplotypspezifische Fragmente, die auf einzelne polymorphe Mitglieder innerhalb der *11/3R*-Familie hindeuten.

3.2.3 Charakterisierung der *11/3R*-Familie in den mutanten *RT1*-Haplotypen *lm1* und *lm3*

Als Referenz für die RFLP-Analyse der beiden *RT1^l*-mutanten Haplotypen *lm1* und *lm3* wurde zunächst der Standardhaplotyp *RT1^l* untersucht. Hier konnten, abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym, bis zu 18 Fragmente nachgewiesen werden, die sowohl mit der allgemeinen Klasse I Sonde pWW6.3 als auch mit mindestens einer der drei Sonden für die *11/3R*-Familie hybridisierten (Abb. 3-22). Darüber hinaus traten in den Restriktionsmustern nur wenige, vornehmlich kürzere Fragmente mit einer Länge kleiner als 6 kb auf, die zwar mit wenigstens einer der *11/3R*-Sonden, nicht aber mit pWW6.3 ein Signal gaben. Die Zahl der *11/3R*-positiven Fragmente erhöhte sich damit je nach Enzym damit auf wenigstens 12 bis maximal 20. Diese umfangreiche Familie *11/3R*-ähnlicher Gene ließ sich anhand ihrer Reaktivität mit der $\Delta 44$ -Sonde in zwei annähernd gleich große Untergruppen unterteilen. Je nach verwendetem Enzym besaßen zwischen 8 und 12 Gene des *l*-Haplotyps dieses $\Delta 44$ -Motiv, bei 5 bis 10 Genen fehlte es.

In den Restriktionsmustern des mutanten Haplotyps *lm1* war deutlich die Reduktion der Fragmentanzahl gegenüber dem Parentalhaplotyp *l* zu erkennen. Die Hybridisierung mit pWW6.3 zeigte, daß in LEW.1LM1 etwa ein Drittel der Klasse I positiven Fragmente fehlen. Diesem Haplotyp ist demnach durch die genomische Deletion eine größere Anzahl von Klasse I Fragmenten verloren gegangen. Von diesen Fragmenten hybridisieren 10 mit den *11/3R*-Sonden NC2/490 und *11/3-2* (vgl. Abb. 3-22 und Abb. 3-23).

Die Hybridisierungen mit der $\Delta 44$ -Sonde gaben für diese in *lm1* deletierten Gene unterschiedliche Befunde. Nach EcoRI-Verdauung hybridisierten nur 2 von 8 der entsprechenden Fragmente im *l*-Haplotyp mit $\Delta 44$, bei den EcoRV-Fragmenten waren es 4 von 5, von den 8 HindIII-Fragmenten hybridisierten alle mit dieser Sonde, und von den 10 XbaI-Fragmenten wiesen 9 das entsprechende Motiv auf. Somit ließ sich nicht eindeutig klären, wie groß die genaue Anzahl der *11/3R*-Gene in *lm1* ist, die das $\Delta 44$ -Motiv enthalten. Dennoch bleibt festzuhalten, daß in *lm1* Gene beider, anhand der PCR-Befunde definierter, Subsets verloren gegangen sind.

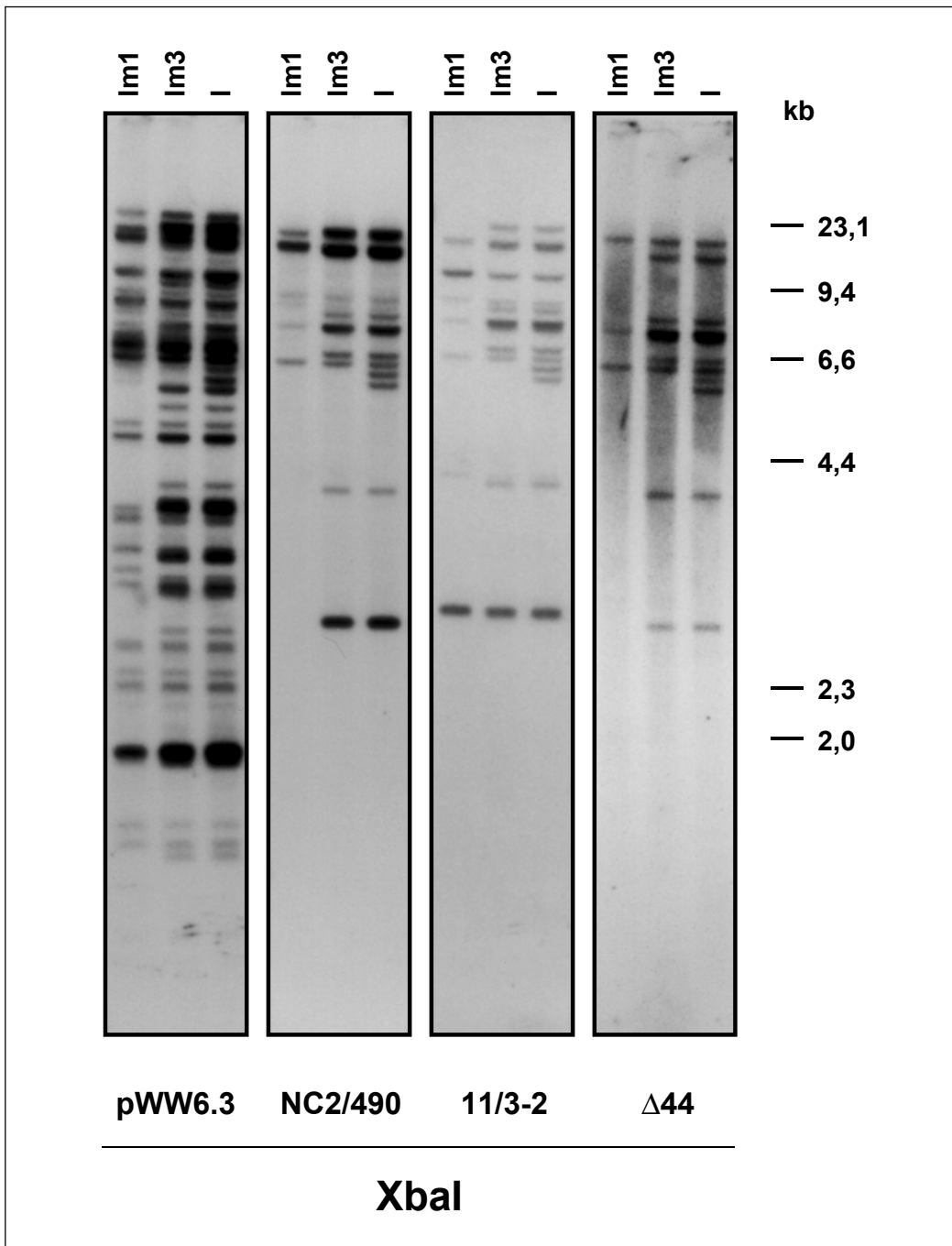


Abbildung 3-22: RFLP-Muster XbaI-geschnittener DNA nach Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden. Gezeigt sind die Autoradiographien desselben Filters nach Hybridisierung mit den jeweils unterhalb vermerkten Sonden. Die mit allen Sonden gezeigte Reduktion der Bandenzahl im *RT1*-Haplotyp *lm1* gegenüber dem Parentalhaplotyp *I* ist besonders auffällig nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde im Bereich zwischen 2 kb und 7 kb.

Tabelle 3-6: XbaI-Fragmente¹⁾ der Haplotypen *lm1*, *lm3*, und *I* nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden zur Charakterisierung der *11/3R*-Genfamilie (vgl. Abb. 3-22).

kb	Typ	pWW6.3			NC2/490			Δ44		
		<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>
25,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22,8	I×	-	+	+	-	+	+	-	-	-
22,5	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
20,1	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
18,7	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
12,3	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8,7	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8,5	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
7,8	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,7	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
7,2	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6,7	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
6,3	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,2	IΔ	-	-	+	-	-	+	-	-	+
6	IΔ	-	-	+	-	-	+	-	-	+
5,7	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5,3	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4,9	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,7	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,1	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
3,95	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3,8	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3,75	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,4	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,3	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3,2	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3,1	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,7	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
2,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,3	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,2	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1,95	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,7	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,6	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,55	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Zum allgemeine Aufbau dieser Tabelle sowie aller folgenden Tabellen der RFLP-Untersuchungen (sofern nicht anders angegeben): Die Ergebnisse der 11/3-2-Hybridisierung wurden zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht in die Tabellen aufgenommen, da sich die hierbei aufgetretenen Fragmentmuster nur geringfügig von denen nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde unterschieden. Traten dennoch informative Unterschiede auf, wurden sie gesondert im Text behandelt. In der Tabelle zeigt ein + ein nachgewiesenes Fragment an; fehlende Fragmente sind mit einem – gekennzeichnet. Neben der Fragmentlänge ist der Typ der für das Signal ursächlichen Sequenz angegeben: eine römische **I** kennzeichnet Klasse I positive, eine **0** Klasse I negative Sequenzen. Mit einem Δ markierte Fragmente enthielten das Δ44-Motiv, bei den mit einem × versehenen Fragmenten fehlte es. Komigrierende Fragmenten sind durch Kommata abgetrennt vermerkt. Nicht in allen Tabellen treten alle eben genannten Elemente auf.

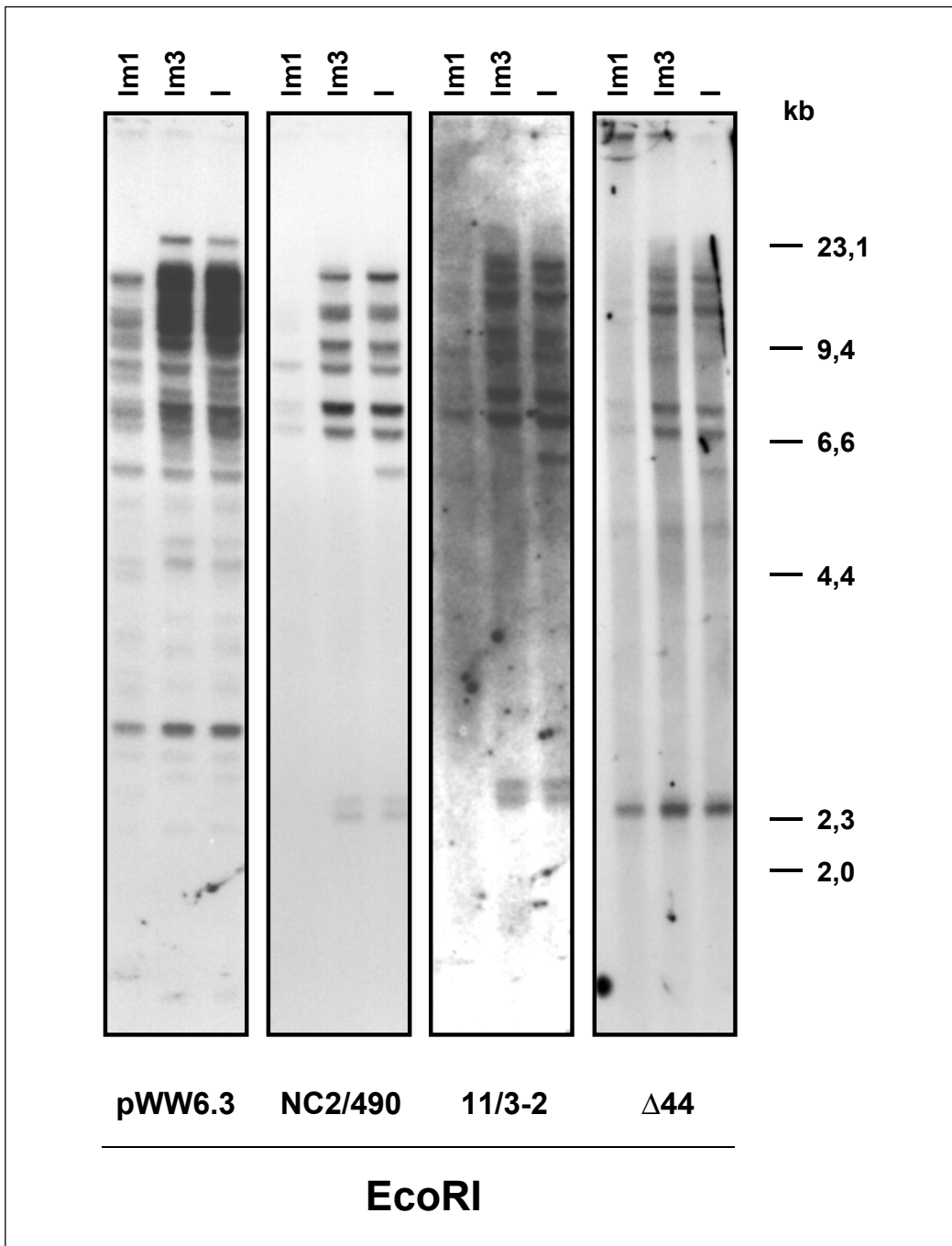


Abbildung 3-23: RFLP-Muster EcoRI-geschnittener DNA nach Hybridisierung mit unterschiedlichen Gensonden. Für die Analysen wurde derselbe Filter nacheinander mit den unterhalb der Autoradiographien bezeichneten Sonden hybridisiert (zwischen den Hybridisierungen wurde die vorangegangene Sonde vollständig von dem Filter entfernt). Die stets geringeren Hybridisierungsintensitäten im Haplotyp *lm1* beruhen nicht auf grob voneinander abweichenden DNA-Mengen in den Proben, sondern stellen vielmehr ein Charakteristikum dieses speziellen Haplotyps dar (vgl. hierzu Seite 84).

Tabelle 3-7: EcoRI-Fragmente¹⁾ der Haplotypen *lm1*, *lm3*, und *I* nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden zur Charakterisierung der *11/3R*-Genfamilie (vgl. Abb. 3-23).

kb	Art	pWW6.3			NC2/490			Δ44		
		<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>	<i>I</i>
26,1	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
22,7	0×	-	-	-	-	+	+	-	-	-
22	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
21,25	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20,6	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
19,8	I	+	+	+	-	+	+	-	-	-
19	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17,9	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
16	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14,4	I×	-	+	+	-	+	+	-	-	-
13,6	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11,6	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10,1	I×	+	+	+	-	+	+	-	-	-
9	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8,3	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7,8	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7,2	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,1	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6,5	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6,3	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6,1	I×, Δ	+	+	+	+	+	+	-	-	+
5,65	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5,45	I, ×	+	+	+	-	-	+	-	-	-
5,2	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,9	IΔ	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4,6	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,4	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,1	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,7	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,35	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,6	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2,4	0×	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2,3	0Δ	-	-	-	-	+	+	-	+	+
2,2	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,35	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Zum allgemeinen Aufbau vgl. Tab. 3-6.

Auf der anderen Seite ließ sich auch in *lm1* noch eine Reihe von Fragmenten nachweisen, die sowohl mit pWW6.3 als auch mit wenigstens einer der *11/3R*-Sonden hybridisierten. Je nach betrachteter Restriktionsverdauung, gehörten 8 bis 11 Klasse I Gene der *11/3R*-Familie an. Aufgrund der Hybridisierung mit $\Delta 44$ ließen sich bei diesen Fragmenten zwei annähernd gleich große Untergruppen unterscheiden. In *lm1* sind also weiterhin beide Subpopulationen in gegenüber *RT1^l* zwar reduzierter, aber untereinander annähernd vergleichbarer Größe vorhanden.

Tabelle 3-8: Aufstellung der in *lm1* gegenüber *l* fehlenden Klasse I Fragmente.¹⁾

Enzym	fehlende Kl.I Fragmente [kb]	Σ ²⁾ [kb]
EcoRI	26,1 / 22 / 21,3 / 19,8 / 17,9 / 14,4 / 10,1 / 8,3 / 6,5 / 6,3 / 6,1 / 5,45 / 2,6 / 1,35	168
EcoRV	12,2 / 11,4 / 8,9 / 8,8 / 8,3 / 8 / 7 / 6 / 1,7	72
HindIII	14,6 / 13,3 / 12,1 / 8,8 / 8,2 / 6,8 / 5,4	69
XbaI	22,8 / 18,7 / 10 / 8,5 / 7,7 / 6,7 / 6,2 / 6 / 5,7 / 5,3 / 4,1 / 3,95 / 3,8 / 3,3 / 3,2 / 2,7 / 2 / 1,55	122

¹⁾ nach Hybridisierung mit pWW6.3

²⁾ Durch Addition der Längen der fehlenden Fragmente läßt sich die Mindestgröße der *lm1*-Deletion abschätzen (Summen gerundet).

Im Gegensatz zu den umfangreichen Unterschieden zwischen *lm1* und *l* traten bei einer weiteren *RT1*-Mutante, BN.1L (*lm3*), nur wenige Abweichungen gegenüber *RT1^l* auf. In den Hybridisierungsmustern mit der Sonde pWW6.3 fehlten bei *lm3*, je nach Restriktionsenzym, maximal drei Fragmente (zusammengefaßt in Tab. 3-9). Alle diese Fragmente fehlten ebenfalls in *lm1*. Dieser Befund bestätigte die in den bisherigen Untersuchungen zur Lage der *lm3*-Deletion vorgeschlagene Lokalisation innerhalb des bei *lm1* deletierten Abschnittes der *RT1.C/E*-Region. Auch die Anzahl der deletierten Gene stimmte mit den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen überein.

Tabelle 3-9: Aufstellung der in *lm3* gegenüber *l* fehlenden Klasse I positiven Fragmente¹⁾.

Enzym	gegenüber <i>l</i> in <i>lm3</i> fehlende Kl.I Fragmente [kb]	Σ ²⁾ [kb]
EcoRI	6,1 / 5,45	12
EcoRV	8,9 / 1,7	11
HindIII	-	-
XbaI	6,2 / 6 / 2	14

¹⁾ nach Hybridisierung mit pWW6.3

²⁾ Durch Addition der Längen der fehlenden Fragmente läßt sich die Mindestgröße der *lm1*-Deletion abschätzen (Summen gerundet).

Die Reaktivität der in *lm3* fehlenden pWW6.3-positiven Fragmente im *l*-Haplotyp mit den übrigen verwendeten Sonden war unterschiedlich. Die beiden in *lm3* fehlenden EcoRV-Fragmente bei 8,9 kb und 1,7 kb hybridisierten mit keiner der drei Sonden für *11/3R*. Auch das 2 kb XbaI-Fragment wurde in *RT1^l* lediglich durch pWW6.3 nachgewiesen. Die übrigen Fragmente waren auch mit den anderen Hybridisierungssonden positiv. Nach HindIII-Verdauung ließ sich für *lm3* außerdem das Fehlen zweier Fragmente bei 4,3 kb und 3,6 kb zeigen, die im *l*-Haplotyp zwar mit allen drei *11/3R* Sonden hybridisierten, nicht aber mit pWW6.3. Diese Befunde deuteten darauf hin, daß durch die genomische Deletion in *lm3* mindestens zwei Klasse I Gene verloren wurden, die beide zur *11/3R*-Familie gehören. Zudem ist es aufgrund der vorliegenden Daten wahrscheinlich, daß beide Gene das $\Delta 44$ -Motiv besitzen. Zusätzlich ist möglicherweise ein weiteres Klasse I Gen deletiert, das nicht zur *11/3R*-Familie gehört.

Bei der Erstbeschreibung des mutanten Haplotyps *RT1^{lm3}* wurde nach einem BamHI/EcoRI-Doppelverdau gezeigt, daß diesem Stamm gegenüber LEW drei Klasse I Fragmente bei 19 kb, 3,5 kb und 1,7 kb fehlen [113]. Durch eine Hybridisierung von entsprechend geschnittener DNA der Haplotypen *l*, *lm3*, *lm1* und *n* mit den Sonden pWW6.3 und NC2/490 sollte nun überprüft werden, ob die fehlenden *11/3R*-Gene mit den in der *lm3*-Erstbeschreibung genannten Klasse I Genen identisch sind.

Nach Hybridisierung mit pWW6.3 fehlten im Muster von *lm3* die beschriebenen drei Fragmente mit Längen von 22 kb, 3,6 kb und 1,6 kb (vgl. Abb. 3-24). Die geringfügigen Abweichungen zu den damals bestimmten Fragmentlängen ergaben sich aus den normalen, methodisch bedingten Ungenauigkeiten und besaßen keine weitergehende Relevanz. Nach Hybridisierung mit NC2/490 fehlten in *lm3*-DNA lediglich zwei Fragmente. Eines war das auch mit pWW6.3 hybridisierende Fragment bei 22 kb, das andere lag bei 5,6 kb und wurde nicht von pWW6.3 nachgewiesen. Die beiden anderen Klasse I positiven Fragmente von 3,6 kb und 1,6 kb traten im Bandenmuster der NC2/490-Sonde nicht auf. Dieser Befund unterstützte die Annahme, daß dem mutanten Haplotyp *lm3* insgesamt drei Klasse I Gene fehlen, von denen zwei der *11/3R*-Familie angehören.

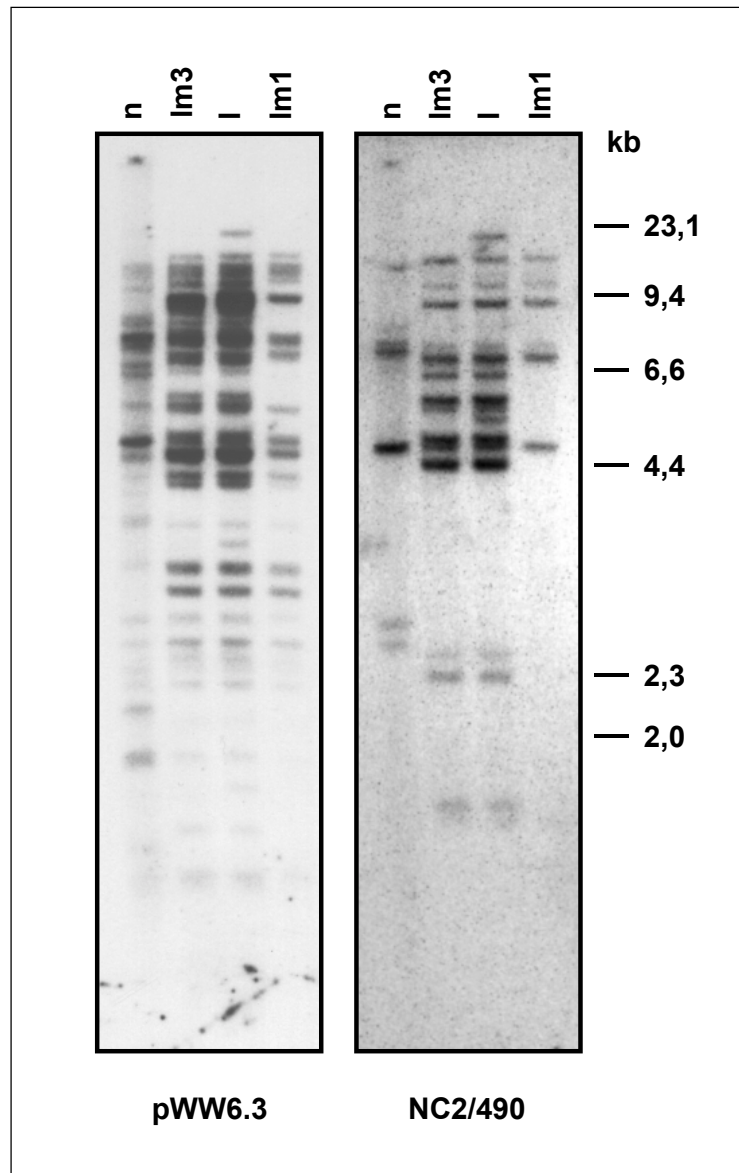


Abbildung 3-24: Vergleich der RFLP-Muster nach BamHI/EcoRI-Doppelverdau von DNA der Haplotypen *n*, *lm3*, *l* und *lm1*. Gezeigt sind die Autoradiographien desselben Filters nach Hybridisierung mit den Sonden pWW6.3 bzw. NC2/490. Nach Hybridisierung mit pWW6.3 fehlten *lm3* drei Fragmente bei 22 kb, 3,6 kb und 1,6 kb. Nach Hybridisierung mit NC2/490 fehlten zwei Banden bei 22 kb und 5,6 kb. Alle diese Fragmente fehlten auch im Muster von *lm1*. Weiterhin fiel bei beiden Hybridisierungen die stark reduzierte Anzahl an hybridisierenden Fragmenten im Haplotyp *RT1ⁿ* auf.

Bei der Analyse der RFLP-Muster nach EcoRI-Verdauung war von besonderem Interesse ob das 6,5 kb EcoRI-Fragment von Cosmid 59 wiedergefunden werden konnte, da auf ihm das *11/3R*-Gen lokalisiert ist, aus dem alle in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungs sonden zum Nachweis der hier untersuchten Genfamilie abgeleitet wurden. In der Erstbeschreibung dieses Klasse I Gens konnte sein Fehlen in *lm1* gezeigt werden. Daher war es ein unerwarteter Befund, daß im entsprechenden Längenbereich der RFLP-Muster kein einziges Fragment zu finden war, das einerseits mit allen Sonden hybridisierte, andererseits in *lm1* fehlte. Ein 7,2 kb EcoRI-Fragment hybridisierte zwar in der für *11/3R* postulierten Art und Weise, war allerdings eindeutig auch in *lm1* vorhanden.

Ob dies ein Beweis für das Vorhandensein des *11/3R*-Gens in LEW.1LM1 ist, sollte durch densitometrische Analysen überprüft werden. Wie Abbildung 3-25 verdeutlicht, gibt es bei diesem speziellen Stamm eine Besonderheit in den RFLP-Mustern, die es bei deren Auswertung zu berücksichtigen gilt. In der Regel ist, bei einander entsprechenden Fragmenten unterschiedlicher Haplotypen, auch eine annähernd gleiche Hybridisierungsintensität zu beobachten. Im *lm1*-Haplotyp ist dies anders. Zwar treten auch bei *lm1* vereinzelt Banden auf, die in der Tat eine vergleichbare Schwärzung zeigen wie die entsprechenden Fragmente anderer Haplotypen. Die überwiegende Mehrzahl der Fragmente hybridisiert jedoch stets deutlich schwächer, als beispielsweise die gleichen Fragmente in *l* oder *lm3*.

Als mögliche Erklärung für die generell schwächere Hybridisierung in *lm1* kann die Existenz mehrerer Restriktionsfragmente gleicher Länge angenommen werden. Diese lassen sich im RFLP-Muster nicht voneinander unterscheiden, da sie in der Elektrophorese mit den gleichen Mobilitäten wandern. Sie komigrieren und bilden eine einzige Bande. Fehlen in einer Probe einige – aber nicht alle – dieser komigrierenden Fragmente, so erscheint trotzdem noch die entsprechende Bande im RFLP-Muster. Da diese Bande aber weniger Fragmente und damit weniger DNA enthält, wird sie ein schwächeres Hybridisierungssignal geben, als die ursprüngliche Bande.

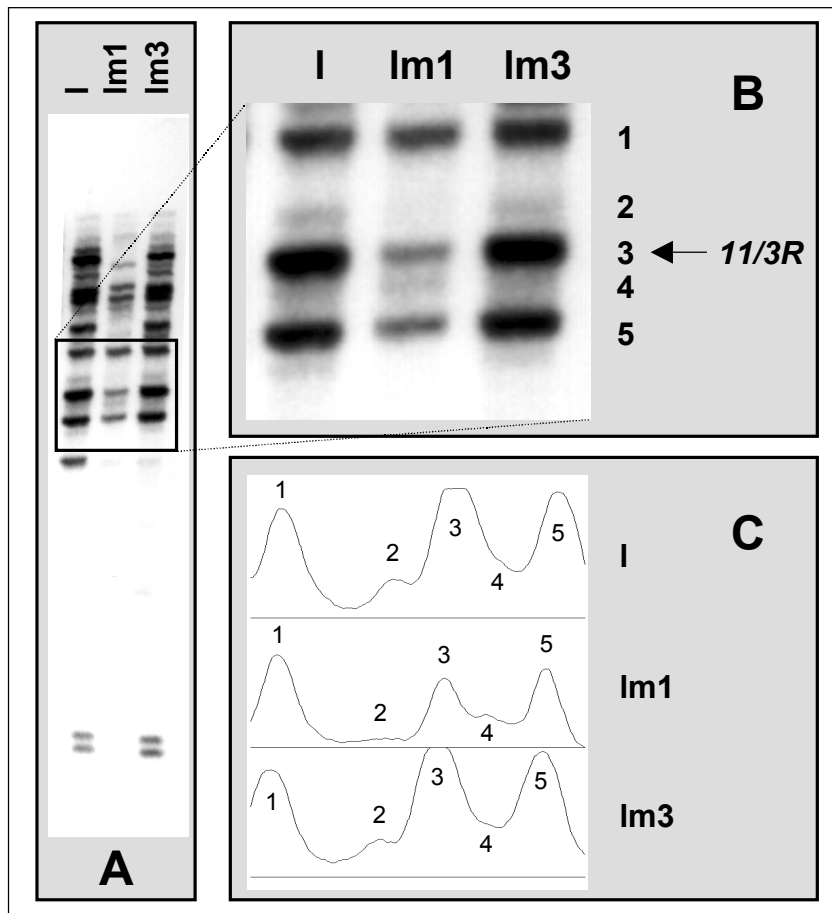


Abbildung 3-25: Vergleich der Hybridisierungsintensitäten von EcoRI-Fragmenten der RTI-Haplotypen *l*, *lm1* und *lm3* nach Hybridisierung mit NC2/490. In der Abbildung ist links die Autoradiographie in Übersicht dargestellt (A). Rechts oben ist der in A umrahmte Bereiche vergrößert gezeigt (B). Die auftretenden Banden sind durchnummeriert. Bande 3 entspricht dem *11/3R*-Fragment von 6,5 kb aus Cosmid 59. Rechts unten sind die densitometrischen Profile für B aufgeführt. Die Numerierung der Peaks in C entspricht den in B bezeichneten Banden.

In Abbildung 3-25 ist diese Betrachtung für das *11/3R*-tragenden EcoRI-Fragment dargestellt. Die dort in dem vergrößerten Ausschnitt (B) mit den Ziffern 1 und 4 gekennzeichneten Banden von 9 kb bzw. 7,1 kb weisen einen annähernd gleichen Schwärzungsgrad auf, wie die korrespondierenden Banden in *l* und *lm3*. Die darunterliegenden Fragmente 2 und 5 (bei 7,8 kb bzw. 6,1 kb), sowie das *11/3R*-tragende Fragment 3 (hier bei etwa 7,2 kb), zeigen demgegenüber in *lm1* deutlich schwächere Signale, als die jeweils entsprechenden Fragmente der beiden Vergleichshaplotypen. Auch bei einem Vergleich der einzelnen Banden eines Haplotyps untereinander, wird der Unterschied deutlich. Sowohl in *l* als auch in *lm3* sind die Banden 3 und 5 erheblich stärker geschwärzt als die jeweilige Bande 1. In *lm1* kehrt sich dieses Verhältnis um; hier sind alle anderen Banden

schwächer als Bande 1. Unterschiedliche DNA-Mengen in den einzelnen Proben gäben keine Erklärung für diesen Befund. Jedoch könnten unterschiedliche Anzahlen von komigrierenden Fragmenten in den jeweiligen Banden der untersuchten Haplotypen diese Phänomene erklären.

Tabelle 3-10: Auswertung¹⁾ der densitometrischen Profile aus Abbildung 3-25C.

Bande²⁾	<i>l</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>
1	14780 ³⁾	12171	14373
2	4930	1449	4793
3	22005	7827	21649
4	3739	3032	3376
5	16328	8209	18891

¹⁾ Die Auswertung erfolgte mit der Bildauswertesoftware *NIH Image* für Apple Macintosh (Version 1.62).

²⁾ Die Numerierung der Banden entspricht der in Abbildung 3-25.

³⁾ Angegeben sind die berechneten Flächen unter den Kurven in dimensionslosen Zahlen.

Die Auswertung der entsprechenden densitometrischen Profile (Abb. 3-25C und Tab. 3-10) zeigt, daß die Dichten der Banden 1 und 4 in allen drei Haplotypen einander etwa entsprechen. Demgegenüber beträgt in *lm1* die Dichte von Bande 5 nur etwa die Hälfte, die der Banden 2 und 3 sogar nur gut ein Drittel der Dichte der entsprechenden Banden in *l* oder *lm3*.

Aus diesen verminderten Bandenintensitäten kann für die Haplotypen *lm3* und *l* abgeleitet werden, daß sich hinter der Bande 5 sehr wahrscheinlich zwei unterschiedliche Restriktionsfragmente mit einer übereinstimmenden Länge von 6,1 kb verbergen, und daß die Banden 2 und 3 vermutlich aus jeweils drei Fragmenten mit Längen von 7,8 kb bzw. 7,2 kb gebildet werden. Die Konsequenz daraus ist, daß in *lm1* mehr Fragmente fehlen, als ursprünglich angenommen. Obwohl die 6,1 kb EcoRI Bande in diesem Haplotyp auftritt, fehlt offensichtlich trotzdem ein Fragment dieser Länge. Und trotz der vorhandenen Banden bei 7,8 kb und 7,2 kb fehlen möglicherweise jeweils zwei der Fragmente entsprechender Länge in *lm1*. Für diesen kleinen Ausschnitt aus dem Fragmentmuster nach EcoRI-Verdauung wäre demnach das Fehlen von bis zu fünf Fragmenten in *lm1* gezeigt, obwohl die entsprechenden Banden in allen drei Haplotypen auftreten. Für die Bestimmung der Anzahl der in *lm1* verlorenen Klasse I Gene ist dies ein wichtiger Befund. Darüber hinaus muß die bisher anhand der Addition der Fragmentlängen der in *lm1* fehlenden Klasse I Fragmente vorgenommene Größenabschätzung der genomischen Deletion nach oben korrigiert werden.

Tabelle 3-11: Vergleich der Bandenintensitäten aus Tabelle 3-10 nach Normierung¹⁾.

Bande²⁾	<i>l</i>	<i>lm1</i>	<i>lm3</i>
1	1	1	1
2	3	1	3
3	3	1	3
4	1	1	1
5	2	1	2

¹⁾ Zur Normierung wurde die jeweilige Dichte der Bande in *lm1* gleich 1 gesetzt.

²⁾ Die Numerierung der Banden entspricht der in Abbildung 3-25.

Das Auftreten des 6,5 kb EcoRI-Fragmentes auch in *lm1* widerspricht also nicht den bisherigen Befunden, nach denen das *11/3R*-Gen in LEW.1LM1 fehlt. Es besagt lediglich, daß es außerhalb der genomischen *lm1*-Deletion noch zumindest ein weiteres, zu *11/3R* homologes Gen gibt, das ebenfalls auf einem 6,5 kb EcoRI-Fragment liegt. Aufgrund der übrigen in dieser Arbeit vorgestellten Befunde ist weiterhin davon auszugehen, daß *11/3R* in LEW.1LM1 deletiert ist.

Somit fehlen in *lm1* alle drei Klasse I Gene von Cosmid 59. Dieser Befund steht der Festlegung der zweiten Grenze der *lm1*-Deletion durch Cosmid 59 nicht entgegen, da sich von dem zu einem geringen Grad mit Cosmid 59 überlappenden Cosmid 25 alle drei Klasse I positiven EcoRI-Fragmente auch im Restriktionsmuster des Haplotyps *lm1* wiederfinden und Cosmid 25 somit bereits eindeutig außerhalb der Deletion liegt.

3.2.4 Charakterisierung der *11/3R*-Familie im mutanten *RT1*-Haplotyp *lm2*

Die in dieser Arbeit erfolgte PCR-Analyse der *lm2*-Mutante hatte gezeigt, daß Gene der *11/3R*-Familie von der genomischen Deletion betroffen waren. Im Mittelpunkt der weiteren Untersuchung dieses Stammes stand daher die Frage, wie viele *11/3R*-homologe Klasse I Gene in *lm2* fehlen. Hierfür wurden in RFLP-Analysen die Restriktionsmuster von *lm2* mit denen beider Parentalstämme verglichen. Nur solche Fragmente, die in *lm2* nicht auftraten und zusätzlich nicht zwischen den Parentalhaplotypen polymorph waren, konnten eindeutig als in *lm2* fehlend bezeichnet werden. Bei in *lm2* zwar nicht vorhandenen, aber zwischen *lv3* und *u* unterschiedlichen Fragmenten, war aufgrund des zusammengesetzten Charakters der *RT1.C/E*-Region von *lm2* eine solche Aussage nicht möglich.

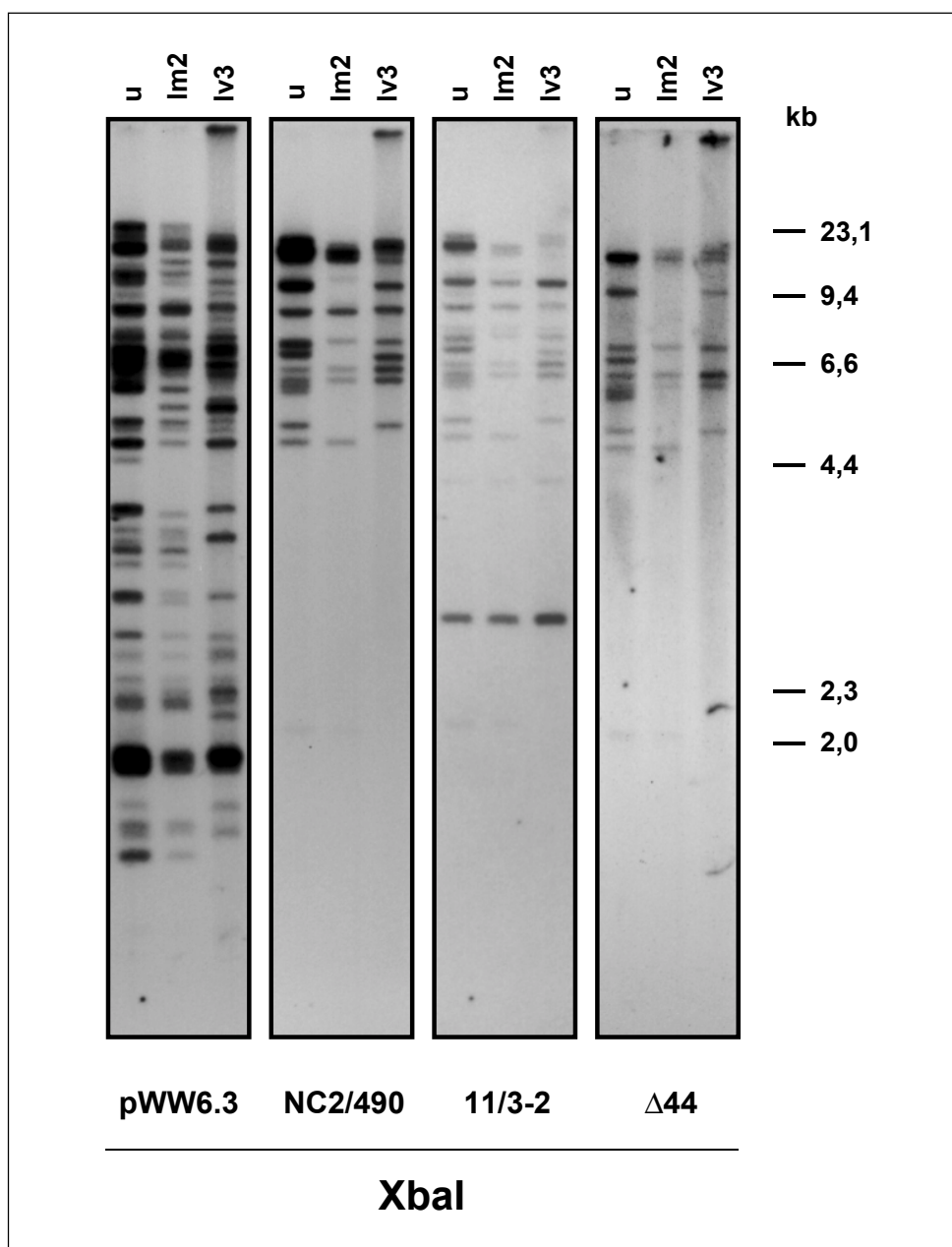


Abbildung 3-26: RFLP-Muster *Xba*I-geschnittener DNA des *RT1*-Haplotyps *lm2* sowie seiner Parentalhaplotypen *u* und *lv3* nach Hybridisierung mit Sonden unterschiedlicher Spezifität. Gezeigt sind die Autoradiographien desselben Filters nach Hybridisierung mit den jeweils unterhalb vermerkten Sonden. Besonders augenfällig ist das Fehlen von nicht zwischen den Parentalhaplotypen polymorphen Fragmenten bei *lm2* in den Hybridisierungsmustern der NC2/490-Sonde.

Wie erwartet, zeigten die Hybridisierung mit pWW6.3, daß LEW.1LM2 Klasse I-positive Fragmente beider Parentalstämme besitzt (vgl. Tab. 3-12). Der C^{lv3} -spezifische Anteil ist mit 1

bis 2 Banden deutlich geringer als der C^u -spezifische mit 5 bis 14 Fragmenten. Den größten Teil mit 10 bis 20 Banden machen in $lm2$ jedoch die zwischen den Parentalhaplotypen nicht unterschiedlichen Fragmente aus.

Tabelle 3-12: Klasse I positive Restriktionsfragmente der Haplotypen u , $lm2$ und $lv3$ nach Hybridisierung mit pWW6.3.

Enzym	u			$lm2$			$lv3$		
	>u< ¹⁾	>np<	>lv3<	>u<	>np<	>lv3<	>u<	>np<	>lv3<
EcoRI	20	12	-	14	11	2	-	12	10
EcoRV	14	19	-	12	10	2	-	19	5
HindIII	6	23	-	5	20	2	-	23	4
XbaI	18	22	-	9	18	1	-	22	9

¹⁾ Es wurde differenziert zwischen u -spezifischen (>u<), $lv3$ -spezifischen (>lv3<) und nicht zwischen diesen Haplotypen unterschiedlichen Fragmenten (>np<).

In $lm2$ fehlten je nach verwendetem Restriktionsenzym zwischen einem und neun der sowohl in u als auch in $lv3$ vorhandenen, Klasse I positiven Fragmente. Nach Verdauung mit EcoRI fehlte $lm2$ eine einzige Bande bei 17,9 kb, nach Verdauung mit HindIII waren 3 Banden bei 22,5 kb, 5,2 kb und 4,7 kb nicht vorhanden, nach XbaI-Verdauung fehlten 4 Fragmente bei 12,3 kb, 9,3 kb, 5,1 kb und bei 1,6 kb, und nach Restriktionsverdauung mit EcoRV zeigte sich das Fehlen von sogar 9 Fragmenten bei 16,3 kb, 12,2 kb, 8,6 kb, 8,3 kb, 6,4 kb, 2,8 kb, 2,7 kb, 2,65 kb und bei 1,6 kb. Diese, verglichen mit den anderen Enzymen, hohe Anzahl von fehlenden EcoRV-Fragmenten in $lm2$, hatte seine Ursache vermutlich in internen Schnittstellen bei mehreren der hybridisierenden Fragmente.

Drei der genannten Fragmente (4,7 kb HindIII, 5,1 kb XbaI und 6,4 EcoRV) kartierten aufgrund ihres Vorkommens in $r14$ und gleichzeitigen Fehlens in $r15$ nicht in die C/E -Region. Sie lagen sehr wahrscheinlich in der $RT1.A$ -Region des u -Haplotyps, und $lv3$ besaß nur zufällig Fragmente gleicher Länge und Spezifität. Drei weitere der nach EcoRV-Verdauung in u und $lv3$ auftretenden und in $lm2$ fehlenden Fragmente von 2,8 kb, 2,7 kb und 2,65 kb konnten ebenfalls nicht in der $RT1.C/E$ -Region liegen. Sie fehlten eindeutig im l -Haplotyp, traten aber interessanterweise gleichzeitig in $r14$ und $r15$ auf. Sie mußten daher aus dem u -Haplotyp stammen und in dem Bereich zwischen den Rekombinationspunkten von $r14$ und $r15$ liegen.

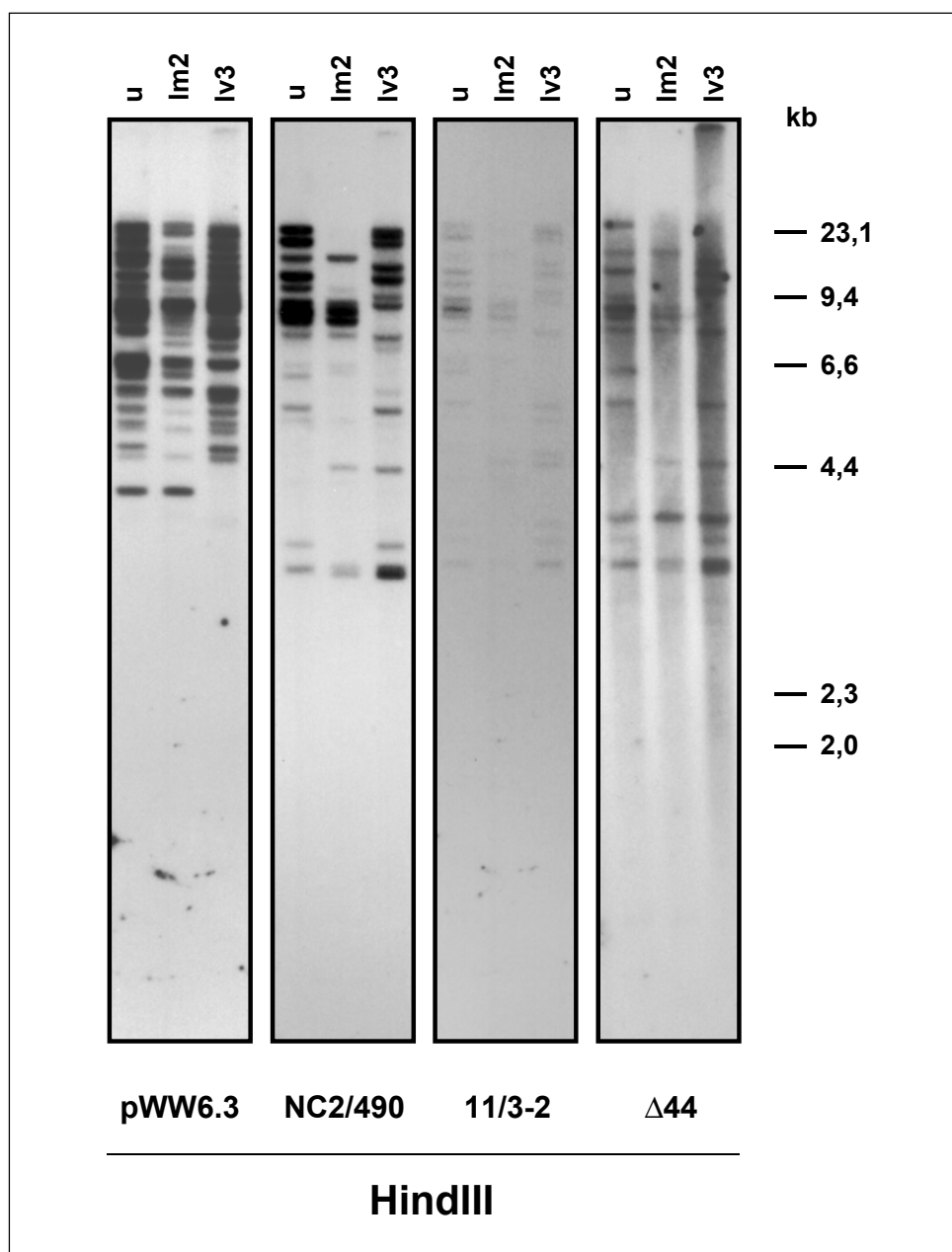


Abbildung 3-27: RFLP-Untersuchung HindIII-geschnittener DNA des *RTI*-Haplotyps *lm2* sowie seiner Parentalhaplotypen *u* und *lv3* nach Hybridisierung mit Sonden unterschiedlicher Spezifität. (die gezeigten Autoradiographien stammen alle von demselben, mehrfach nacheinander hybridisierten Filter) Die RFLP-Muster nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde zeigen deutlich die Anteile beider Parentalhaplotypen in der *RTI.C/E*-Region von *lm2*, sowie das Fehlen einzelner Fragmente in diesem Haplotyp.

Tabelle 3-13: HindIII-Fragmente nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden zur Charakterisierung der *11/3R*-Genfamilie im mutanten *RT1*-Haplotyp *lm2* (vgl. Abb. 3-27).

kb	Typ	pWW6.3			NC2/490			$\Delta 44$		
		<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>	<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>	<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>
25,4	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23,4	I, Δ	+	+	+	+	-	+	+	-	+
23	I, \times	+	+	+	-	-	+	-	-	-
22,5	I	+	-	+	-	-	-	-	-	-
20,7	I \times	+	+	+	+	-	+	-	-	-
18,3	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16,6	I Δ	+	+	-	+	+	-	+	+	-
15,6	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14,6	I, Δ	-	+	+	-	-	+	-	-	+
13,3	I, Δ	+	+	+	+	-	+	+	-	+
12,1	0 Δ	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11,2	I \times	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10,3	I, Δ	+	+	+	-	-	+	-	-	+
9,1	I \times	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8,8	I, Δ	+	+	+	+	+	-	+	+	-
8,7	I, Δ	+	+	+	+	+	-	+	+	-
8,2	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7,8	I Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,2	I, \times	-	+	+	-	-	+	-	-	-
6,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6,5	I \times	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6,3	I \times , Δ	+	+	-	+	+	-	+	-	-
5,9	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5,85	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5,8	I \times	-	-	+	-	-	+	-	-	-
5,55	I Δ	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5,4	I, Δ	+	+	+	-	-	+	-	-	+
5,2	I	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5,1	I \times	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4,8	0 \times	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4,7	I	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4,5	I \times	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4,3	0 Δ	-	-	-	-	+	+	-	+	+
4,15	0 \times	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4,1	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	0 \times	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3,9	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3,8	0, 0 Δ	-	-	-	+	-	-	+	+	+
3,6	0 Δ	-	-	-	+	-	+	+	-	+
3,4	0 Δ	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3,3	0 Δ	-	-	-	-	+	+	-	+	+
3,1	0 Δ	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2,9	0 \times	-	-	-	+	+	+	-	-	-
1,4	0 Δ	-	-	-	+	+	-	+	+	-

Zum Tabellenaufbau siehe Tab 3-6.

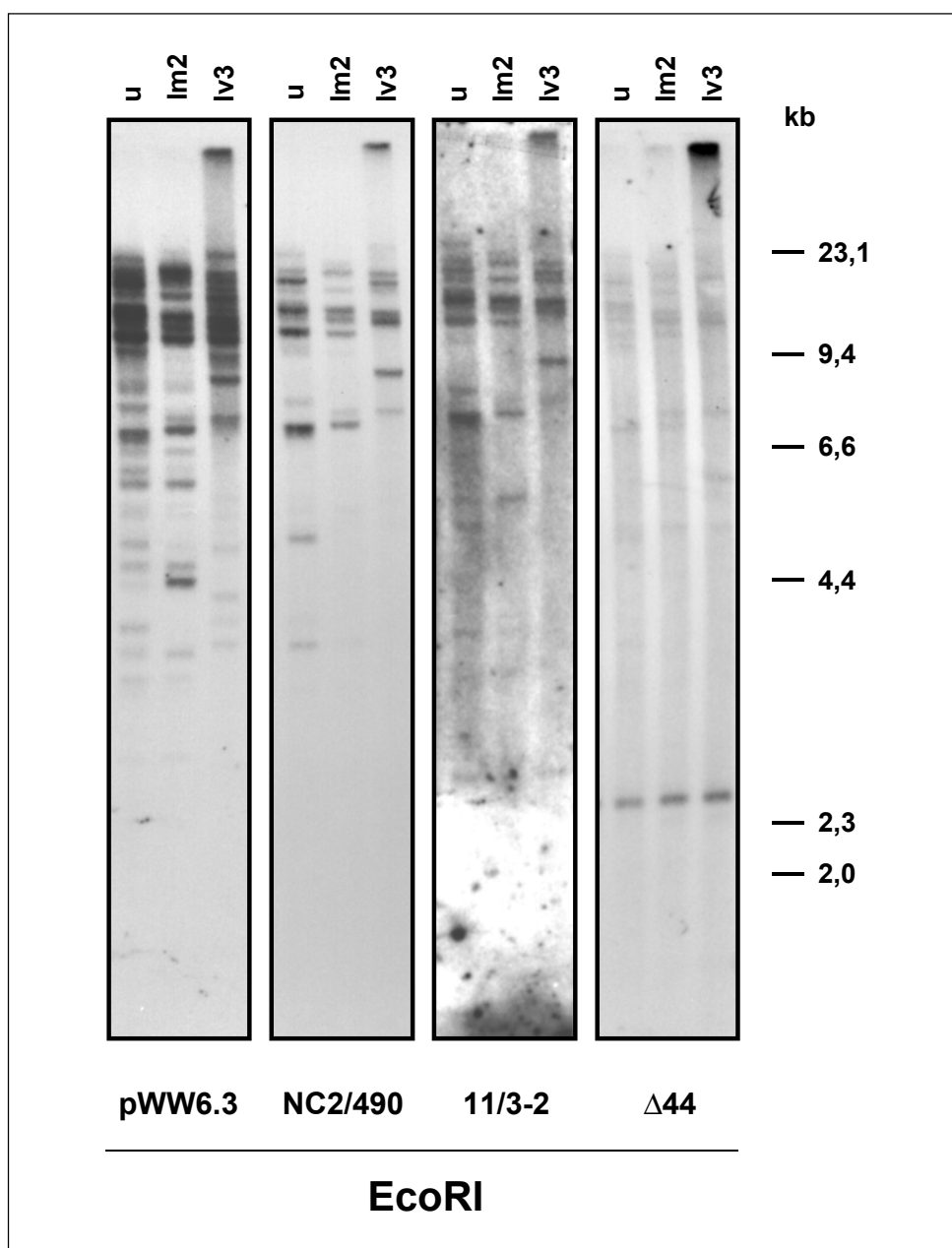


Abbildung 3-28: RFLP-Untersuchung EcoRI-geschnittener DNA des *RT1*-Haplotyps *Im2* und seiner Parentalhaplotypen *u* und *Iv3* mittels Hybridisierung mit Sonden unterschiedlicher Spezifität. Derselbe Filter wurde nacheinander mit den jeweils unterhalb der Autoradiographien vermerkten Sonden hybridisiert. Bei den nach der $\Delta 44$ -Hybridisierung auftretenden, starken Signalen bei 2,4 kb handelte es sich vermutlich um eine unspezifische Bindung der synthetischen Oligonukleotid-Sonde. Alle anderen mit dieser Sonde hybridisierenden Fragmente ließen sich auch mit der Klasse I-Sonde pWW6.3 nachweisen.

Tabelle 3-14: EcoI-Fragmente nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden zur Charakterisierung der *11/3R*-Genfamilie in dem mutanten *RT1*-Haplotyp *lm2* (vgl. Abb. 3-28).

kb	Art	pWW6.3			NC2/490			Δ44		
		<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>	<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>	<i>u</i>	<i>lm2</i>	<i>lv3</i>
26,1	I×	-	+	+	-	+	+	-	-	-
24,7	I×	+	-	-	+	-	-	-	-	-
22,7	I×	+	+	-	+	+	+	-	-	-
22	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21,25	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20,6	I, ×	+	+	-	+	+	+	-	-	-
19,8	I×	-	-	+	-	-	+	-	-	-
19	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
17,9	I	+	-	+	-	-	-	-	-	-
16	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14,4	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13,6	I, Δ	+	+	+	+	+	-	+	+	-
11,6	I, ×	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10,1	I, 0×	-	-	+	+	-	-	-	-	-
9	I×	-	-	+	-	-	+	-	-	-
8,8	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8,7	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	I×	+	-	-	+	-	-	-	-	-
7,8	IΔ	-	+	+	-	+	+	-	+	+
7,4	IΔ	+	+	-	+	+	-	+	+	-
7	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6,3	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5,9	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5,8	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5,65	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5,45	I×	+	+	+	+	+	+	-	-	-
5,2	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4,9	IΔ, ×	+	+	+	+	-	-	+	+	+
4,6	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4,4	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4,2	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4,1	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3,9	I×	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3,8	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3,7	I×	+	+	-	+	+	-	-	-	-
3,5	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2,8	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2,4	0Δ	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2,2	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Erklärungen zum Tabellenaufbau siehe Tab. 3-6.

Die Hybridisierungen mit der NC2/490-Sonde belegten, daß auch *11/3R*-ähnliche Gene von der *lm2*-Deletion betroffen waren. Im Vergleich zu den Parentalhaplotypen fehlten *lm2* bis zu 5 der mit dieser Sonde hybridisierenden und nicht zwischen *u* und *lv3* polymorphen Banden. Nach EcoRI-Verdauung ließ sich hierbei kein Unterschied feststellen, jedoch fehlten in XbaI-geschnittener DNA von LEW.1LM2 zwei Fragmente, ein in die *C/E*-Region kartierendes bei 12,3 kb, sowie das in der *A*-Region liegende bei 5,1 kb. Nach Restriktionsverdau mit HindIII fehlten vier Banden bei 23,4 kb, 20,7 kb, 13,3 kb und 3,6 kb, und schließlich nach EcoRV-Verdauung zwei Fragmente bei 8,6 kb und 8,3 kb, sowie das 6,4 kb *A*-Region Fragment und zwei in die Klasse III Region kartierende Banden bei 2,7 kb und 2,65 kb. Mit Ausnahme des 3,6 kb HindIII-Fragmentes hybridisierten alle diese Fragmente ebenfalls mit pWW6.3 und, außer des 20,7 kb HindIII-Fragmentes und der 8,3 kb EcoRV-Bande, auch alle mit der $\Delta 44$ -Sonde.

Tabelle 3-15: Mit der NC2/490-Sonde positive Restriktionsfragmente der Haplotypen *u*, *lm2* und *lv3*.

Enzym	<i>u</i>			<i>lm2</i>			<i>lv3</i>		
	>u< ¹⁾	>np<	>lv3<	>u<	>np<	>lv3<	>u<	>np<	>lv3<
EcoRI	8	10	-	3	10	1	-	10	3
EcoRV	7	9	-	6	4	1	-	9	4
HindIII	9	12	-	6	8	2	-	12	9
XbaI	7	11	-	3	9	-	-	11	2

¹⁾ Es wurde differenziert zwischen *u*-spezifischen (>u<), *lv3*-spezifischen (>lv3<) und den nicht zwischen diesen Haplotypen unterschiedlichen Fragmenten (>np<).

Durch die genomische Deletion in *lm2* sind nach den vorliegenden Befunden bis zu 5 Klasse I Gene verloren gegangen, von denen wahrscheinlich 3 der *11/3R*-Familie angehören. Hiervon tragen 2 das $\Delta 44$ -Motiv und eines nicht. Diese deletierten Gene liegen in einem etwa 40 kb umfassenden Bereich am Anfang der *RT1.C/E*-Region.

3.2.5 Verteilung der *11/3R*-homologen Klasse I Gene innerhalb der *RT1.C/E*-Region

Nachdem die Anzahl der *11/3R*-homologen Gene mittels RFLP-Analyse für eine Reihe von *RT1*-Haplotypen geklärt werden konnte, stellte sich die Frage nach ihrer Lokalisation. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese Analysen größerer DNA-Fragmente durchgeführt. Nach MluI-Verdauung wurde DNA der Haplotypen *l*, *lm1* und *lm3* aufgetrennt, mit den Sonden pWW6.3 und NC2/490 hybridisiert und die erhaltenen Bandenmuster miteinander verglichen (Abb. 3-29).

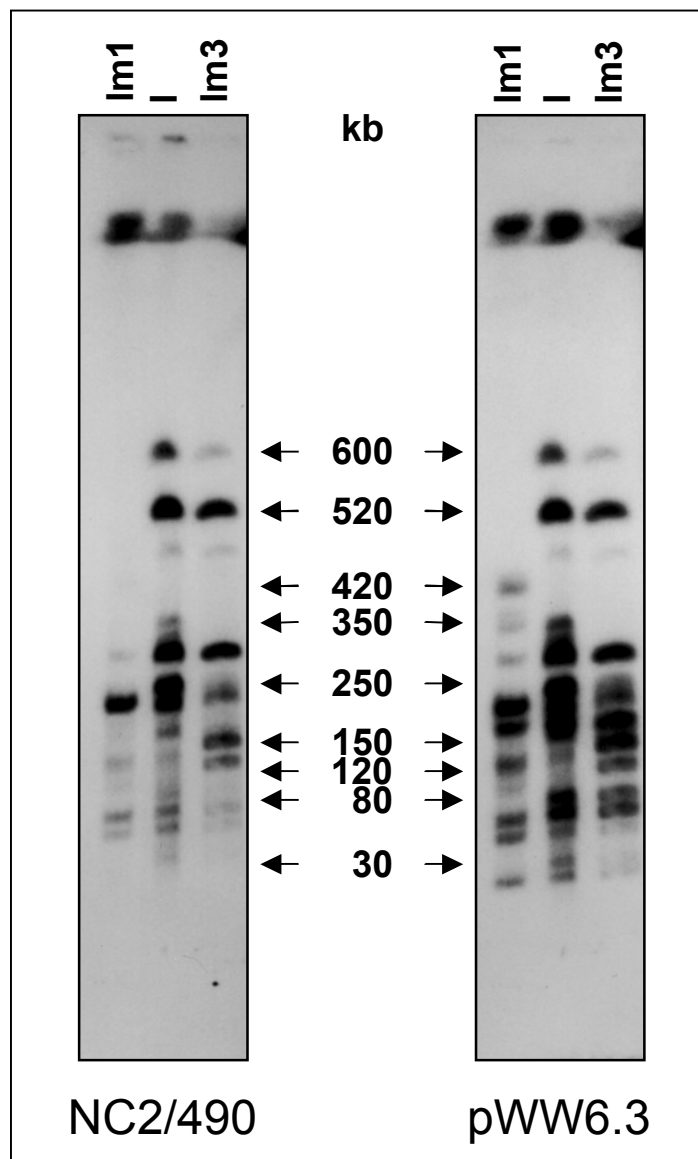


Abbildung 3-29: Vergleichende PFGE-Analyse MluI geschnittener DNA mit den Hybridisierungssonden NC2/490 und pWW6.3. Gezeigt sind die Autoradiographien des gleichen, nacheinander mit beiden Sonden hybridisierten Filters (die jeweils vorangegangene Hybridisierungssonde wurde vor einer erneuten Hybridisierung vollständig von dem Filter entfernt). Bei nahezu identischen Mustern betraf der wichtigste Unterschied das pWW6.3-positive 350 kb Fragment. Mit der NC2/490-Sonde fehlte es in *lm1* und *lm3*, war aber in *l* noch klar nachweisbar. Die zahlreichen Übereinstimmungen beider Fragmentmuster belegten für die *11/3R*-Familie eine Verteilung über einen großen Bereich der *RT1.C/E*-Region zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5fl*.

Tabelle 3-16: Vergleich der MluI-Fragmente nach Hybridisierung mit pWW6.3 und NC2/490.

Fragment [kb]	pWW6.3			NC2/490		
	<i>l</i>	<i>lm3</i>	<i>lm1</i>	<i>l</i>	<i>lm3</i>	<i>lm1</i>
600	+	+	-	+	+	-
520	+	+	-	+	+	-
420	-	-	+	-	-	-
350	+	-	+	+	-	-
310	+	+	+	+	+	+
250	+	+	-	+	+	-
225	+	+	+	+	+	+
170	+	+	+	+	+	+
150	-	+	-	-	+	-
135	+	+	+	+	+	+
120	-	+	-	-	+	-
90	+	+	+	+	+	+
80	+	+	-	+	+	-
65	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+
30	+	+	-	+	+	-
20	+	+	+	-	-	-

Die mit den beiden Sonden erhaltenen Fragmentmuster waren weitgehend identisch. Sowohl die *Pou5f1*-tragenden Fragmente bei 600 kb und 520 kb, als auch das *Bat1* und *Tnfa* enthaltende 225 kb Fragment, hybridisierten in *RT1^l* auch mit der NC2/490-Sonde. Ein wesentlicher Unterschied nach der NC2/490-Hybridisierung bestand jedoch in dem Fehlen des Klasse I positiven Fragments bei 350 kb im Haplotyp *lm1* (Erläuterungen siehe Text).

Hierbei zeigte sich, daß im *l*-Haplotyp mit Ausnahme eines 20 kb MluI-Fragmentes alle pWW6.3-Banden auch mit NC2/490 nachweisbar waren (Tab. 3-16). In *RT1^{lm3}* fehlte neben dem eben genannten 20 kb Fragment das gleiche 350 kb MluI-Fragment, das auch in dem Muster nach pWW6.3-Hybridisierung nicht vorhanden war. Wie im *l*-Haplotyp, traten auch in *lm3* alle anderen mit pWW6.3 gezeigten Fragmente ebenfalls mit der NC2/490-Sonde auf.

In allen drei betrachteten Haplotypen hybridisierte das mit den Sonden für *Bat1* und *Tnfa* reaktive 225 kb Fragment auch mit der NC2/490-Sonde (vgl. 3.1.1, Seite 44). Dieser Befund belegte die Existenz von Mitgliedern der *11/3R*-Familie am zentromeren Rand der *RT1.C/E*-Region in der Nähe von *Bat1*.

In den Haplotypen *l* und *lm3* hybridisierten zudem beide *Pou5f1*-tragenden Fragmente bei 600 kb und 520 kb mit der NC2/490-Sonde (vgl. 3.1.2, Seite 46). Die entsprechenden *lm1*-Fragmente bei 420 kb und 350 kb traten nach NC2/490-Hybridisierung jedoch nicht auf. Diese Befunde zeigten zum einen, daß im *l*-Haplotyp auch in diesem Bereich der *RT1.C/E*-Region, kurz vor dem Marker *Pou5f1*, sicher *11/3R*-ähnliche Gene liegen. Zum anderen belegte die fehlende NC2/490-Hybridisierung des 350 kb-Fragmentes im Muster von *lm1*, daß es sich

hierbei nicht um das im *l*-Haplotyp nachgewiesene, pWW6.3-positive MluI-Fragment gleicher Größe handelte. Ein 350 kb MluI-Fragment, das mit pWW6.3 und mit NC2/490 hybridisiert, fehlt in *lm3* und ist auch im Haplotyp *lm1* nicht vorhanden (vgl. 3.1.3, Seite 52).

Die Beobachtung, daß nahezu alle Klasse I positiven Fragmente auch mit der NC2/490-Sonde nachweisbar waren, machte deutlich, daß die Gene der *11/3R*-Familie sehr wahrscheinlich zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1* über einen recht großen Bereich verteilt liegen.

3.3 Untersuchung eines neuen mutanten *RTI*-Haplotyps in der *RTI.C/E*-Region (*RTI^{uml}*)

Ausgangspunkt für die hier dargestellte Untersuchung waren Experimente in denen ein weiterer Haplotyp mit einer Mutation in der *RTI.C/E*-Region entdeckt wurde. Dieser Haplotyp kann zur Strukturaufklärung dieser Region beitragen.

Bei der serologischen *RTI*-Testung der F2-Generation einer LEW.1U × LEW.7B-Zucht, fiel eines der Tiere dadurch auf, daß es homozygot *RTI^{A^u}* typisiert wurde, jedoch heterozygot *u/l* für die *C*-Region-Antigene war. Um die festgestellte Rekombinante als kongene Zuchtlinie zu erhalten, erfolgte die Rückkreuzung auf den Parentalhaplotyp LEW.1U. Die anschließende Verpaarung heterozygoter Nachkommen des gewünschten Haplotyps führte schließlich zu der Etablierung einer homozygoten Zuchtlinie. Diese trägt die laborinterne Bezeichnung LEW.1UM1.

Die serologische Typisierung verschiedener Tiere dieses neuen Stammes, sowohl mit Antiseren gegen *RTI.A^l*, *RTI.B/D^l* und *RTI.C^l* in komplementabhängigen Zytotoxizitätstests, als auch mit einer Reihe von Antikörpern unterschiedlicher *RTI.C*-Spezifität, zeigte keinerlei nachweisbaren Unterschiede zu der bereits vor einiger Zeit entdeckten und als kongene Zuchtlinie geführten *RTI*-Rekombinante LEW.1R14 auf. Beide Linien wurden übereinstimmend *A^uB/D^uC^l* typisiert. Um zu überprüfen, ob beide Stämme wirklich den gleichen MHC besitzen, wurde eine Reihe von allogenen Transplantationsexperimenten durchgeführt. Die Transplantation von Haut des neuen Stammes auf LEW.1R14 führte zu akuter Abstoßung des Transplantats. Damit war gezeigt, daß sich die beiden Haplotypen in ihrer *RTI.C/E*-Region voneinander unterscheiden. Umgekehrt wurden *r14*-Hauttransplantate von der neuen Mutante auf unbestimmte Zeit akzeptiert. Dieser Befund belegte, daß es durch ein ungleiches Crossing-over während der Rekombination zu einem Zugewinn an exprimierten Klasse I Genen in der *RTI.C/E*-Region des neuen Stammes gekommen sein mußte. Der Haplotyp hat das serologisch nachweisbare *C^u*-Molekül verloren.

3.3.1 Kartierung des Rekombinationspunktes von LEW.1UM1 mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese

Aufgrund der vorangegangenen Transplantationsexperimente war klar, daß zwischen LEW.1R14 und der neuen Rekombinanten deutliche Unterschiede an der Rekombinationsstelle in der *RTI*-Region bestehen. Im Zuge der molekulargenetischen

Charakterisierung der neuen Rekombinanten sollte daher überprüft werden, ob diese Unterschiede mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit neu gefundenen PFGE-Polymorphismen für zwei der Bezugsmarker der *RTI.C/E*-Region, *Bat1* und *Pou5f1*, faßbar waren.

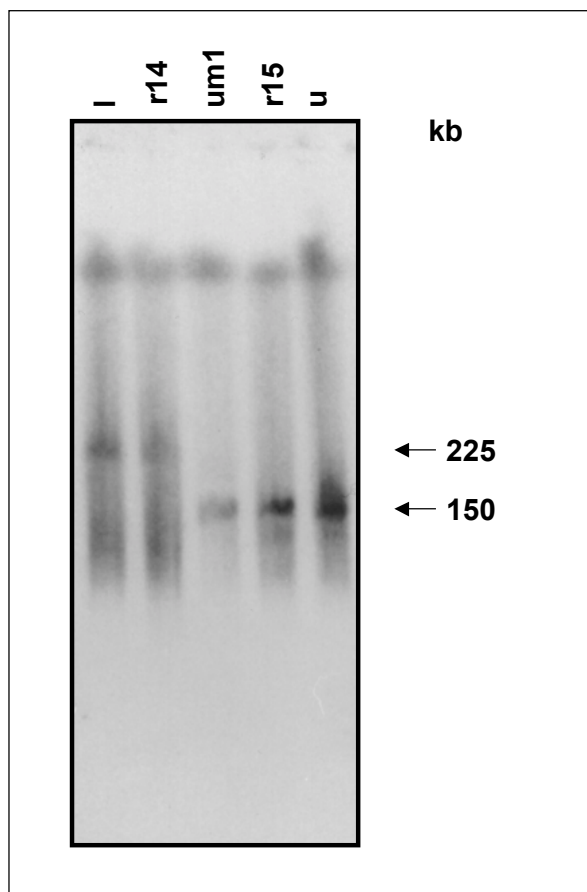


Abbildung 3-30: Hybridisierung MluI geschnittener DNA mit einer *Bat1*-Sonde. Die *RTI*-Haplotypen *l* und *u* unterscheiden sich in der Länge des hybridisierenden Fragmentes. Der mutante Stamm LEW.1UM1 zeigte mit der *Bat1*-Sonde nur die *RTI*^u-typische Bande bei 150 kb.

In MluI-geschnittener DNA konnte mit einer *Bat1*-Sonde ein PFGE-Polymorphismus zwischen den *RTI*-Haplotypen *u* und *l* gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.1.1, Seite 44). Der rekombinante Stamm LEW.1R14 besaß nach Hybridisierung mit der *Bat1*-Sonde das gleiche 225 kb MluI-Fragment wie LEW (Abb. 3-30). Im Gegensatz hierzu wies die neue Rekombinante LEW.1UM1 die für den *RTI*^u-Haplotyp charakteristische Bande bei 150 kb auf. Das Rekombinationsereignis in *um1* hatte folglich telomer von *Bat1* stattgefunden, das Rekombinationsereignis in *r14* dagegen zentromer von *Bat1*.

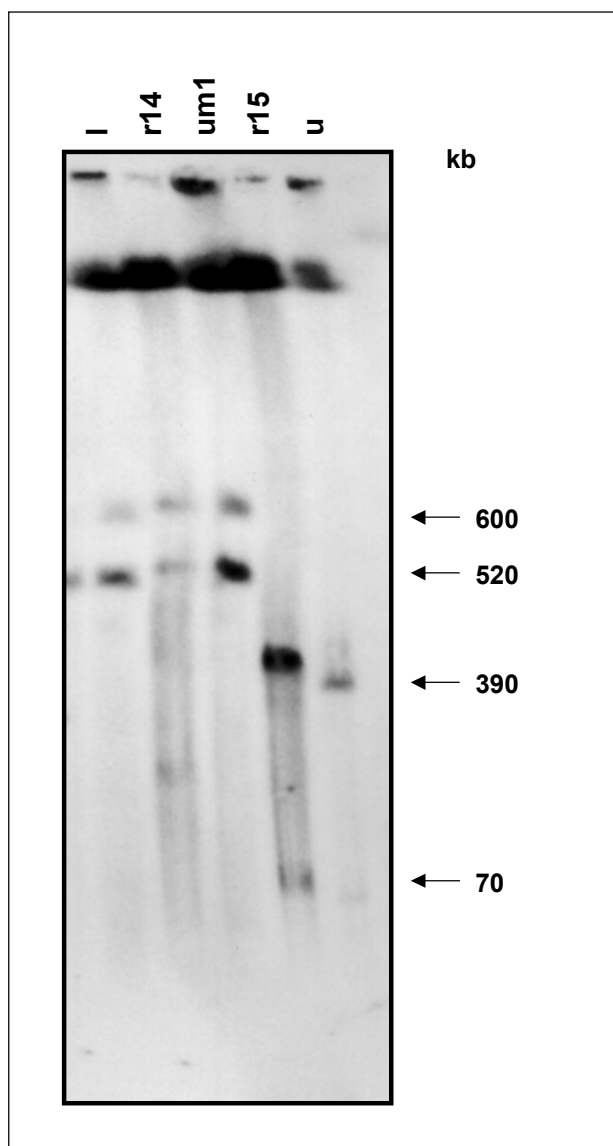


Abbildung 3-31: Hybridisierung MluI-geschnittener DNA mit einer Pou5f1-Sonde. Die RT1-Haplotypen *l* und *u* unterscheiden sich in der Länge der hybridisierenden Fragmente. Der mutante Stamm LEW.1UM1 zeigte mit der Pou5f1-Sonde die RT1^l-typischen Banden bei 600 und 520 kb.

Der telomer zu *Bat1* nächstgelegene Marker in der RT1.C/E-Region ist *Pou5f1*, für den ebenfalls in PFGE-Untersuchungen ein zwischen den Haplotypen RT1^u und RT1^l unterschiedliches MluI-Fragment gefunden wurde (vgl. Abschnitt 3.1.2, Seite 46). Nach Hybridisierung mit der Sonde für *Pou5f1* unterschieden sich LEW.1R14 und LEW.1UM1

nicht voneinander (Abb. 3-31). Beide zeigten das gleiche Hybridisierungsmuster wie LEW. Der Rekombinationspunkt in dieser neu gefundenen Rekombinante liegt demnach zentromer von *Pou5f1*.

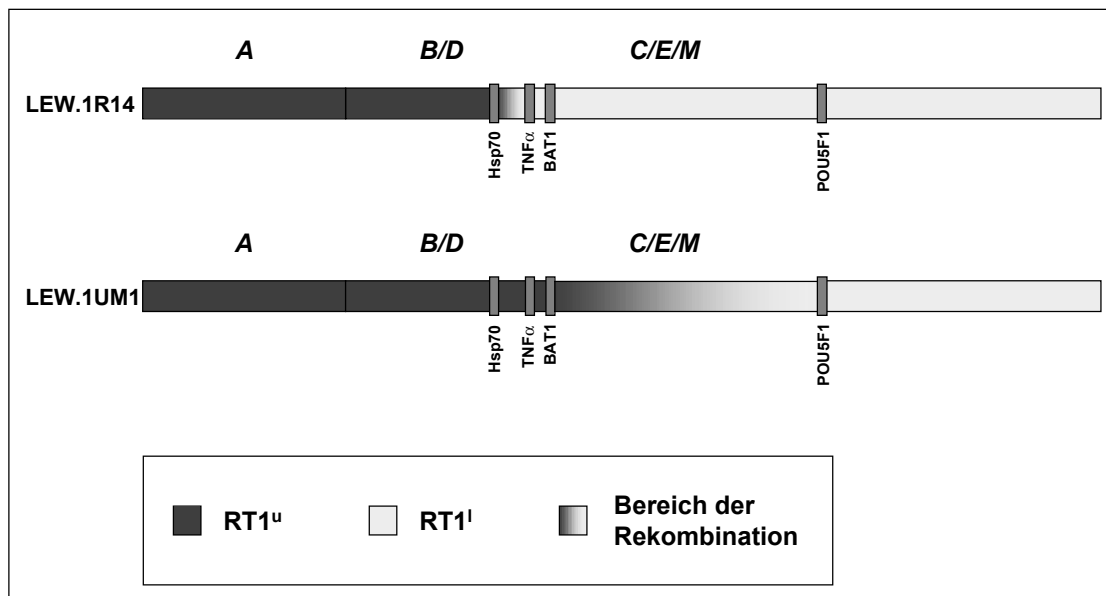


Abbildung 3-32: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Rekombinationsbereiche der Stämme LEW.1R14 und LEW.1UM1. In *r14* liegt der Rekombinationspunkt zwischen *Hsp70* und *Tnfα* und damit vor der *RT1.C/E*-Region [114]. In *um1* fand das Rekombinationsereignis zwischen *Bat1* und *Pou5f1* statt und kartiert somit in die *RT1.C/E*-Region. In diesem Bereich erfolgte in *um1* ein ungleiches Crossing-over, durch das es in diesem Haplotyp zu einem Zugewinn an exprimierten Klasse I Molekülen gekommen ist.

Mit den hier erhaltenen Befunden ließ sich der Rekombinationspunkt von *um1* in den Bereich zwischen den Markergenen *Bat1* und *Pou5f1* kartieren. Das Rekombinationsereignis erfolgte somit eindeutig innerhalb der *RT1.C/E*-Region, und folglich enthält diese in der neuen Rekombinanten Anteile beider Parentalstämmen (Abb. 3-32). Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu LEW.1R14, deren Rekombinationspunkt innerhalb der Klasse III Region zwischen *Hsp70* und *Tnfα* liegt und deren *RT1.C/E*-Region daher vollständig aus dem *l*-Haplotyp stammt [114].

Die akute Abstoßung von *um1*-Haut durch *r14* findet damit ihre Erklärung in dem *u*-spezifischen Anteil der *RT1.C/E*-Region, der *um1* von *r14* unterscheidet. Unklar ist indes noch, wieso *r14*-Haut von LEW.1UM1 unbegrenzt akzeptiert wird. Entweder werden die zentromer vom Rekombinationspunkt in *um1* gelegenen Klasse I Gene aus dem *l*-Haplotyp nicht exprimiert oder *um1* enthält aufgrund eines ungleichen Crossing-over zusätzlich auch die

C/E-Region von *RT1^l*. In beiden Fällen würde *um1* in dem aus *r14* stammenden Hauttransplantat keine Oberflächenantigene erkennen, in denen sich beide Haplotypen unterscheiden. Mit Hilfe der PFGE-Untersuchungen war hierzu keine weitergehende Klärung möglich.

3.3.2 Charakterisierung der *RT1.C/E*-Region von LEW.1UM1 mittels RFLP-Analyse

Die PFGE-Untersuchung von LEW.1UM1 kartierte dessen Rekombinationspunkt innerhalb der *RT1.C/E*-Region zwischen *Bat1* und *Pou5fl*. Da zwischen diesen beiden Genen keine weiteren bekannten Marker liegen, die für eine zusätzliche Charakterisierung genutzt werden konnten, wurde dieser neue Haplotyp durch eine Reihe von Klasse I-RFLP-Analysen näher untersucht. Die RFLP-Muster des neuen Stammes wurden dabei, zusätzlich zu denen beider Parentalhaplotypen, *RT1^u* und *RT1^l*, mit denen der rekombinanten Stämme LEW.1R14 und LEW.1R15 verglichen. Hierdurch wurde die Zuordnung einzelner Fragmente zu einer der beiden Klasse I-Regionen ermöglicht.

Tabelle 3-17: Anzahl der Klasse I-positiven Restriktionsfragmente¹⁾ der Haplotypen *l*, *um1* und *u*.

Enzym	<i>l</i>			<i>um1</i>			<i>u</i>		
	> < ²⁾	>np<	>u<	> <	>np<	>u<	> <	>np<	>u<
EcoRI	17	23	-	15	23	9	-	23	9
EcoRV	12	18	-	11	18	13	-	18	14
HindIII	6	20	-	5	20	10	-	20	10
XbaI	18	22	-	17	22	18	-	22	18

¹⁾ nach Hybridisierung mit pWW6.3

²⁾ Es wurde differenziert zwischen *l*-spezifischen (>|<), *u*-spezifischen (>u<) und nicht zwischen diesen Haplotypen unterschiedlichen Fragmenten (>np<).

Bei den Hybridisierungen mit der pWW6.3-Sonde fiel zunächst auf, daß *um1* ein deutlich komplexeres Bandenmuster aufwies, als die Vergleichshaplotypen (Abb. 3-33 bis 3-36). Alle zwischen *l* und *u* nicht polymorphen Fragmenten waren jeweils auch in der neuen Mutante zu finden. Wie in Tabelle 3-17 zusammengefaßt, fehlten *um1* zudem auffallend wenige der haplotypspezifischen Fragmente beider Parentalstämme.

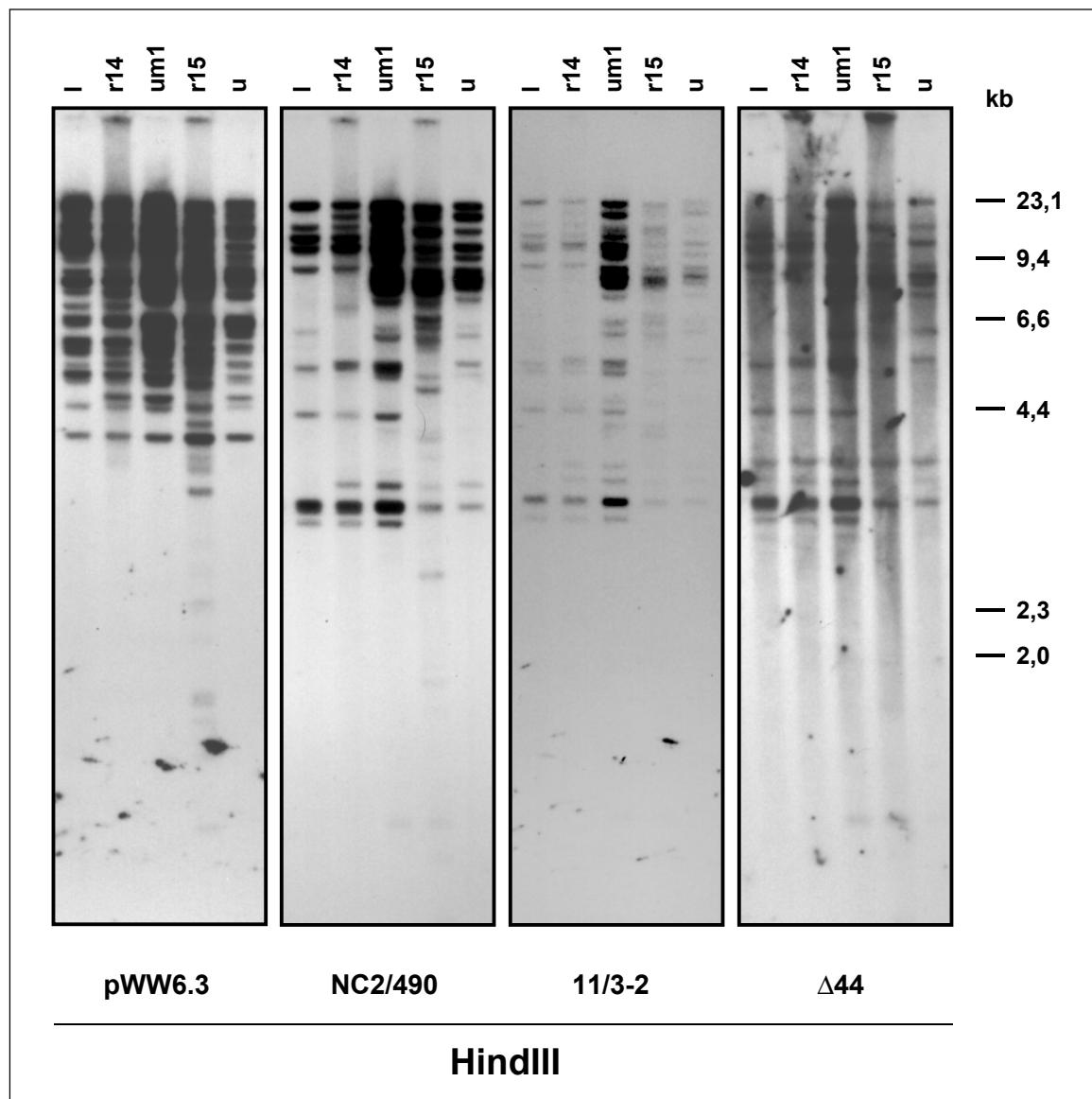


Abbildung 3-33: RFLP-Analyse *HindIII*-geschnittener DNA der *RT1*-Haplotypen *I*, *r14*, *um1*, *r15* und *u*. Bei diesen Autoradiographien desselben Filters waren die sehr starken Hybridisierungssignale des *um1*-Haplotyps auf eine größere DNA-Menge in der Probe zurückzuführen. In dem Größenbereich unterhalb 5 kb trat eine Reihe von Klasse I-negativen Fragmenten auf, die mit den drei 11/3R-Sonden deutliche Signale gaben. Diese waren vermutlich auf interne *HindIII*-Schnittstellen in den betreffenden Genen zurückzuführen.

Tabelle 3-18: HindIII-Fragmente nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden (vgl Abb. 3-33).

kb	Art	pWW6.3					NC2/490					Δ44				
		<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>	<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>	<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>
25,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,4	I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,4	I×, Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
23	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22,5	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20,7	I×	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
18,3	I×, I	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
17,8	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16,6	IΔ	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
14,6	IΔ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
13,3	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12,1	IΔ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
11,2	I×	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
10,3	IΔ, I	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
9,1	I×	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
8,8	I, Δ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8,7	IΔ	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
8,2	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,8	I, Δ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
7,2	I×	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6,8	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	I, ×	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
6,4	0×	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6,3	IΔ	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
6,1	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,9	I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,85	I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,55	I, Δ	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
5,4	IΔ, I	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
5,2	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,1	I×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4,7	I	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,3	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
4,15	0×	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
4,1	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0×	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3,9	I	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,8	0Δ, 0×	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3,6	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,4	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,3	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
3,2	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
3,1	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,9	0×	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1,4	0Δ	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

Erklärungen zum Tabellenaufbau siehe Tab. 3-6.

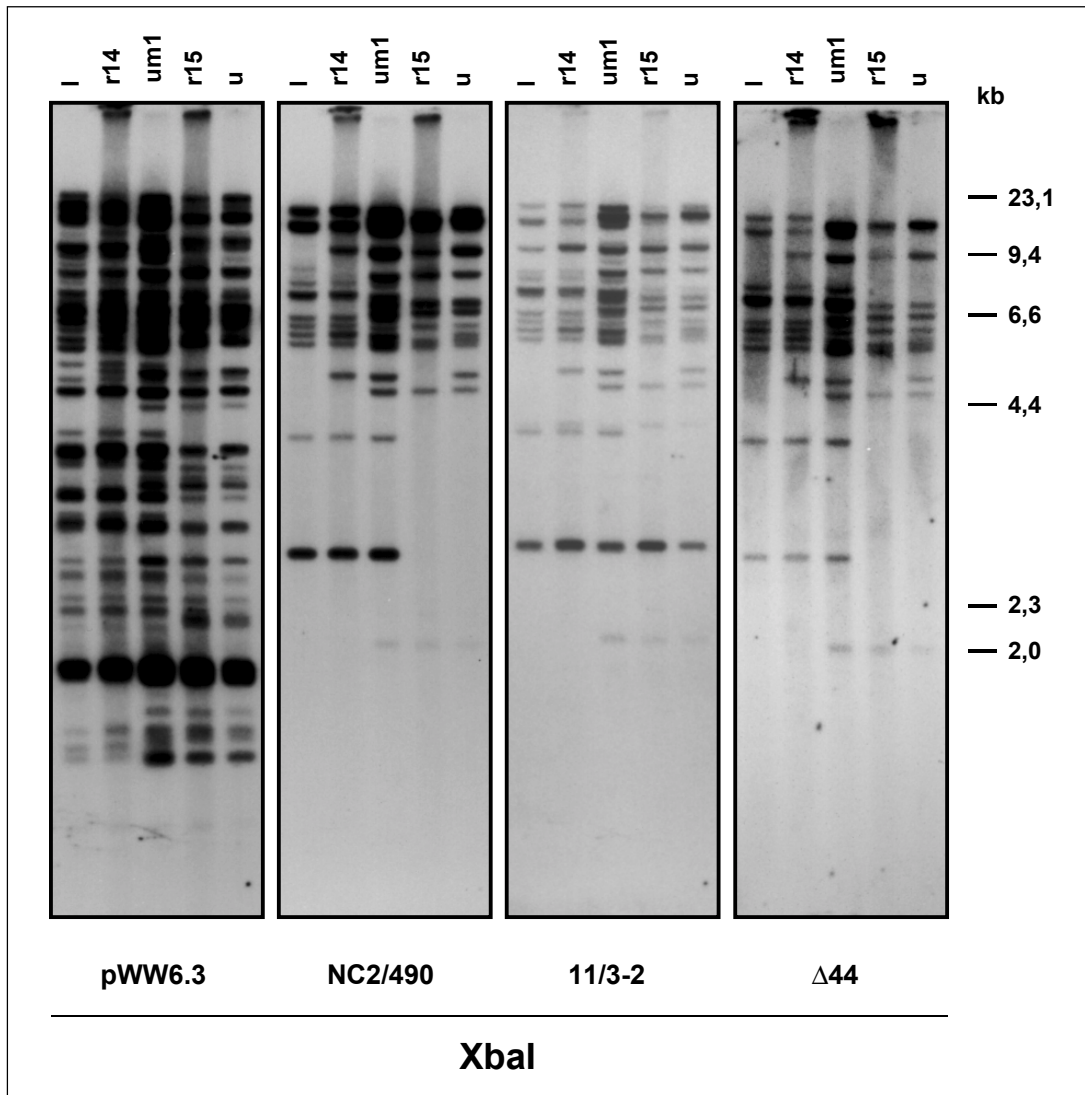


Abbildung 3-34: RFLP-Analyse XbaI-geschnittener DNA der RTI-Haplotypen *l*, *r14*, *um1*, *r15* und *u*. Anhand der polymorphen Fragmente nach Hybridisierung mit der NC2/490- oder der $\Delta 44$ -Sonde ist der zusammengesetzte Charakter des MHC von LEW.1UM1 besonders deutlich zu erkennen.

Nach Verdauung der DNA mit HindIII fehlte *um1* eines der *l*-spezifischen Fragmente bei 7,2 kb. Es kartierte klar in die *C/E*-Region, da es in *r14* ebenfalls vorlag, aber in *r15* fehlte. Das gleiche galt für die beiden nach EcoRI-Restriktion in LEW.1UM1 fehlenden *RTI^l*-Banden bei 9 kb und 5,2 kb. Auch sie kartierten eindeutig nach *RTI.C/E*. Anders verhielt es sich mit dem in *um1* fehlenden 9 kb XbaI-Fragment. Dieses *l*-spezifische Klasse I Fragment war in *r15* zu finden und fehlte in *r14*. Daher konnte es nicht in der *RTI.C/E*-Region liegen, sondern mußte vor den Rekombinationspunkten von *r14* und *r15* lokalisiert sein und lag vermutlich in

der *A*-Region. Hingegen kartierte das *um1* fehlende, aus dem *l*-Haplotyp stammende 7,75 kb EcoRV-Fragment aufgrund seiner Stammverteilung in *r14* und *r15* nach *RT1.C/E*. Von den *u*-spezifischen Banden fehlte in *um1* lediglich nach EcoRV-Verdauung eine Bande bei 4,85 kb. Diese war in *r15*, nicht aber in *r14* zu finden, und kartierte daher ebenfalls in die *C/E*-Region. Bei den übrigen Restriktionen waren jeweils alle *u*-spezifischen Banden auch in *um1* vorhanden.

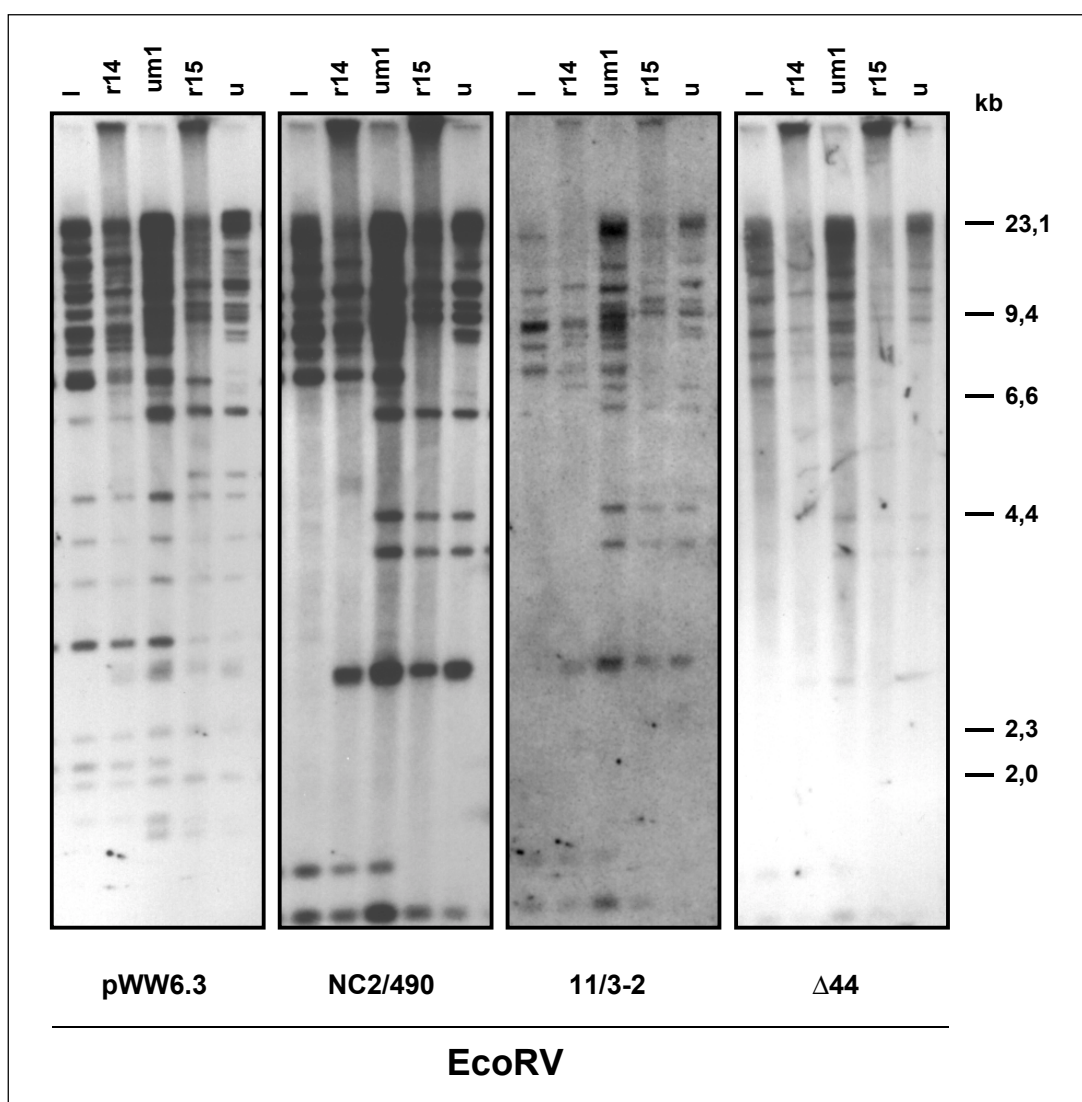


Abbildung 3-35: RFLP-Analyse EcoRV-geschnittener DNA der RT1-Haplotypen *l*, *r14*, *um1*, *r15* und *u*. Nach Hybridisierung mit pWW6.3 zeigte sich in *um1* das Fehlen einer einzigen *u*-spezifischen Bande bei 4,85 kb, die außer in *u* nur noch im rekombinanten Haplotyp *r15* auftrat und daher eindeutig in die *RT1.C/E*-Region kartierte. Dieses Fragment hybridisierte mit keiner der anderen Sonden. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Fragment um das serologisch nachweisbare C^u -Molekül.

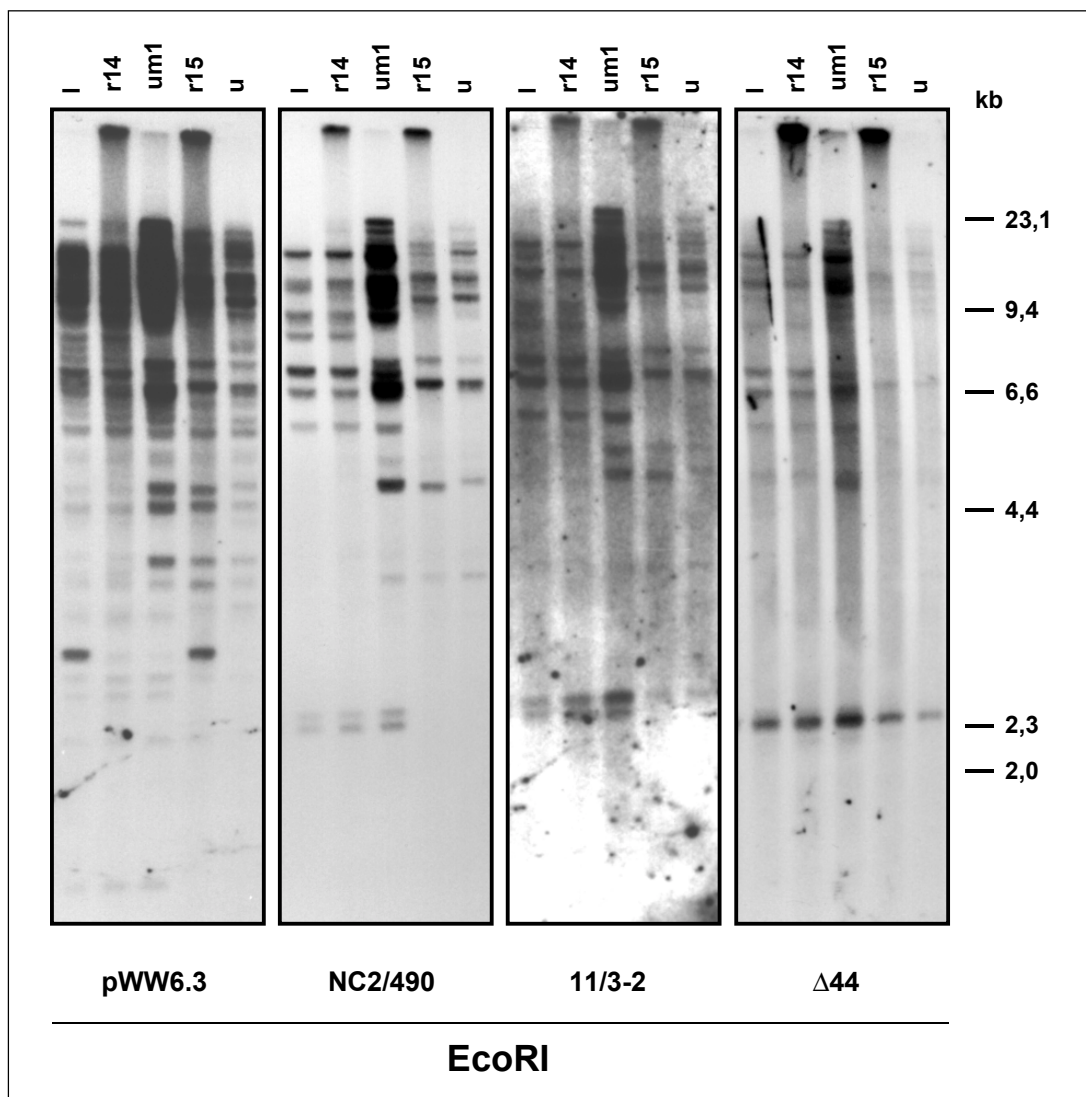


Abbildung 3-36: RFLP-Analyse EcoRI-geschnittener DNA der RT1-Haplotypen *l*, *r14*, *um1*, *r15* und *u*. Deutlich sind anhand der polymorphen Fragmente nach NC2/490-Hybridisierung die Anteile beider Parentalhaplotypen am MHC von LEW.1UM1 zu erkennen.

Tabelle 3-19: EcoRI-Fragmente nach Hybridisierung mit verschiedenen Gensonden (vgl. Abb. 3-36).

kb	Art	pWW6.3					NC2/490					Δ44				
		<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>	<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>	<i>l</i>	<i>r14</i>	<i>um1</i>	<i>r15</i>	<i>u</i>
26,1	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24,7	I×	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
22,7	I×, 0×	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
22	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21,25	I, IΔ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
20,6	I×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
19,8	I×	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	I, ×	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
17,9	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	IΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14,4	I×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13,6	I, Δ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
11,6	I×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10,1	I×	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	IΔ	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
8,8	I	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,7	I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,3	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	I×	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
7,8	IΔ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
7,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,4	IΔ	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
7,2	IΔ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
7,1	I×	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	I	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,3	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,1	IΔ	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
5,9	I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,65	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,45	I×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5,2	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,9	I, Δ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4,6	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,1	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,9	I×	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3,8	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7	I, ×	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3,5	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,35	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,8	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4	0×, 0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
2,3	0Δ	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
2,2	I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,35	I	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Den RFLP-Befunden zufolge lagen in *um1* die meisten mit den verwendeten Sonden nachweisbaren Klasse I Gene aus der *C/E*-Region beider Parentalhaplotypen vor. Lediglich zwei Klasse I Gene des *l*-Haplotyps sowie eines aus *RT1^u* fehlten. Da zusätzlich auch alle nicht zwischen den Parentalstämmen unterschiedlichen Fragmenten in *um1* vorkamen, war die Gesamtzahl an Klasse I positiven Fragmenten in LEW.1UM1 gegenüber beiden Parentalstämmen deutlich erhöht. Bei Restriktionsverdauung mit XbaI besaß LEW.1UM1 57 unterscheidbare, Klasse I positive Banden; damit hatte diese Mutante sowohl gegenüber LEW als auch gegenüber LEW.1U 17 Fragmente mehr. Dieser Befund bestätigte, daß die Rekombination bei LEW.1UM1 zu einer Gewinn-Mutation führte. Wie groß der Zugewinn in *um1* mindestens war, ließ sich über die Addition der beobachteten Fragmentlängen in den einzelnen Haplotypen abschätzen.

Tabelle 3-20: Berechnung des Zugewinns an Klasse I Fragmenten in *RT1^{um1}* gegenüber *RT1^l* und *RT1^u*.

Enzym	pWW6.3-Fragmente [kb] ¹⁾			Zugewinn [kb] ²⁾ gegenüber	
	<i>l</i>	<i>u</i>	<i>um1</i>	<i>l</i>	<i>u</i>
EcoRI	365 ³⁾	326	444	79	118
EcoRV	290	303	397	107	94
HindIII	274	314	375	101	61
XbaI	301	300	409	108	109
∅	308	311	406	99	96

¹⁾ Addition der Längen der in *l*, *u* und *um1* auftretenden Klasse I-Fragmente

²⁾ Differenzen der addierten Fragmentlängen

³⁾ alle Angaben gerundet

Gegenüber beiden Parentalhaplotypen waren in *um1* zusätzlich jeweils etwa 100 kb Klasse I-Sequenzen tragende DNA vorhanden (Tab. 3-20). In weiteren RFLP-Analysen sollte daher die *11/3R*-Familie der *C/E*-Region in dem neuen Haplotyp untersucht werden. Wie bei den bisherigen RFLP-Analyse der Deletionsmutanten traten auch hierbei zwischen den Hybridisierungsmustern der Sonden NC2/490 und 11/3-2 nur geringfügige Unterschiede auf.

Wie erwartet, zeigte sich auch nach Hybridisierung mit NC2/490 deutlich der zusammengesetzte Charakter der *RT1.C/E*-Region von LEW.1UM1 (Tab. 3-21). Insgesamt traten mit dieser Sonde allerdings weniger Fragmente auf, als nach der pWW6.3-Hybridisierung. Die Mehrzahl der NC2/490-Fragmente war auch mit pWW6.3 positiv. Dennoch trat eine Reihe von neuen, vornehmlich kürzeren Fragmenten auf, die nicht mit

pWW6.3 hybridisierte. Diese Banden gingen vermutlich auf Klasse I Gene zurück, die zwischen den Bindungsorten für pWW6.3 und NC2/490 interne Schnittstellen besitzen. Ihre Zahl variierte zwischen einem einzigen, C^l -spezifischen XbaI-Fragment bis hin zu je vier C^l -spezifischen, C^u -spezifischen und monomorphen Fragmenten nach HindIII-Verdauung.

Tabelle 3-21: Anzahl der positiven Restriktionsfragmente nach NC2/490-Hybridisierung der Haplotypen *l*, *um1* und *u*.

Enzym	<i>l</i>			<i>um1</i>			<i>u</i>		
	> < ¹⁾	>np<	>u<	> <	>np<	>u<	> <	>np<	>u<
EcoRI	9	8	-	8	8	9	-	8	9
EcoRV	7	5	-	7	5	11	-	5	11
HindIII	10	7	-	9	7	13	-	7	13
XbaI	7	10	-	6	10	8	-	10	8

¹⁾ Es wurde differenziert zwischen *l*-spezifischen (>|<), *u*-spezifischen (>u<) und nicht zwischen diesen Haplotypen unterschiedlichen Fragmenten (>np<).

Davon unbeeinflusst, führte die Betrachtung der in *um1* vorhandenen NC2/490-Banden zu einem ähnlichen Ergebnis, wie die der pWW6.3-Fragmente. Alle der gleichermaßen in beiden Parentalhaplotypen vorhandenen Banden waren ebenfalls in LEW.1UM1 zu finden. Auch alle C^u -spezifischen Fragmente besaß der neue Haplotyp. Da dieser zusätzlich fast alle haplotypspezifischen Fragmente aus LEW aufwies, war auch hier wieder die Fragmentzahl in *um1* gegenüber beiden Parentalstämmen deutlich erhöht (vgl. Tab. 3-21). Der neue Haplotyp besaß nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde zwischen 23 und 29 Fragmente und damit gegenüber beiden Parentalhaplotypen rund ein Drittel mehr. Diese Fragmente konnten mit der $\Delta 44$ -Sonde bei allen Haplotypen jeweils in zwei etwa gleich große Untergruppen unterteilt werden, je nachdem, ob sie das betreffende Motiv enthielten oder nicht.

Die Analyse der in *um1* fehlenden, NC2/490-reaktiven Fragmente zeigte die spezifischen Anteile beider Parentalhaplotypen ebenfalls. Mit keinem Enzym fehlte *um1* mehr als ein einziges *l*-spezifisches Fragment. Das Fehlen eines *u*-spezifischen Fragmentes in *um1* wurde nicht beobachtet. Von den beiden nach EcoRI-Verdauung fehlenden, C^l -spezifischen Klasse I-Fragmenten hybridisierte das größere, bei 9 kb liegende, ebenfalls mit NC2/490 (Abb. 3-36). Außerdem war es in den Mustern von LEW und LEW.1R14 auch nach Hybridisierung mit 11/3-2 und $\Delta 44$ zu finden. Es handelte sich daher um ein Mitglied der 11/3R-Familie, das das $\Delta 44$ -Motiv trägt. Auch das nach Restriktion mit HindIII in LEW.1UM1 fehlende, C^l -spezifische 7,2 kb Fragment hybridisierte mit der NC2/490-Sonde (Tab. 3-18). Im Gegensatz zu dem 9 kb EcoRI-Fragment trat es jedoch im Hybridisierungsmuster von 11/3-2 oder $\Delta 44$

nicht auf. Das entsprechende Gen enthält daher das $\Delta 44$ -Motiv nicht. Dies ist ein Hinweis auf das mögliche Fehlen eines zweiten *11/3R*-Genes des *l*-Haplotyps in *um1*.

Das nach der pWW6.3-Hybridisierung in *um1* fehlende und sicher außerhalb der *C/E*-Region liegende 9 kb *XbaI*-Fragment aus dem *l*-Haplotyp war auch mit den Sonden NC2/490 und 11/3-2 darstellbar, nicht aber mit $\Delta 44$ (Abb. 3-34). Seine Lokalisation außerhalb der *C/E*-Region zeigte, daß auch im *l*-Haplotyp nicht alle *11/3R*-ähnlichen Sequenzen innerhalb von *RT1.C/E* liegen.

In *XbaI*-geschnittener DNA von LEW.1UM1 fehlte noch ein weiteres *C^l*-spezifisches Fragment bei 22,5 kb, wie jedoch nur die Hybridisierung mit $\Delta 44$ zeigte (Abb. 3-34). In den Hybridisierungsmustern mit den anderen Sonden – also auch mit pWW6.3 – trat das 22,5 kb *XbaI*-Fragment in allen Haplotypen auf. Hinter dieser Bande verbargen sich demnach eindeutig zwei Klasse I Gene, ein *C^l*-spezifisches und ein *C^u*-spezifisches. Nur anhand des $\Delta 44$ -Motivs ließen sich diese beiden voneinander unterscheiden. Das aus dem *u*-Haplotyp stammende Gen trug das Motiv nicht, gehörte aber zur *11/3R*-Familie und mußte in *um1* vorhanden sein, da dort sowohl mit NC2/490 als auch mit 11/3-2 eine Bande bei 22,5 kb hybridisierte. Wie mit der $\Delta 44$ -Sonde gezeigt wurde, enthielt das aus dem *l*-Haplotyp kommende Fragment das $\Delta 44$ -Motiv, und es fehlte in *um1*. Dieses 22,5 kb *XbaI*-Fragment ist ein weiteres Beispiel für die Schwierigkeit, komigrierende Restriktionsfragmente in RFLP-Mustern voneinander zu unterscheiden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß anhand der RFLP-Analysen von LEW.1UM1 mit keiner der vier verwendeten Hybridisierungssonden ein Hinweis auf das Fehlen einer größeren Zahl von Klasse I Genen der *RT1.C/E*-Region, weder aus *RT1^l* noch aus *RT1^u*, gefunden wurde. Nach keiner der Restriktionsverdauungen wurde das Fehlen von mehr als zwei *l*-spezifischen Fragmenten nachgewiesen und auch nur in einem einzigen Experiment zeigte sich das Fehlen einer einzelnen *u*-spezifischen Bande. Dieses in *um1* fehlende Klasse I Fragment des *u*-Haplotyps repräsentiert möglicherweise das letzte Klasse I Gen der proximalen *RT1.C/E^u*-Region vor *Pou5f1* und entspricht dem serologisch nachweisbaren *C^u*-Molekül. Die in *um1* fehlenden Fragmente des *l*-Haplotyps liegen hingegen im Anfangsbereich der *RT1.C/E*-Region in der Nähe des Markers *Bat1*. Zwei der Gene gehören der *11/3R*-Familie an, eines trägt das $\Delta 44$ -Motiv, das andere nicht. Zusätzlich fehlt möglicherweise ein drittes Klasse I Gen, das nicht der *11/3R*-Familie angehört.

3.3.3 Vergleich von LEW.1UM1 mit den Deletionsmutanten der *RT1.C/E*-Region

Bei der RFLP-Analyse von LEW.1UM1 war die folgende Frage von besonderem Interesse: Welche der in den drei beschriebenen Deletionsmutanten aus der *RT1.C/E*-Region fehlenden Fragmente besitzt die neue Zugewinnmutante?

Aufgrund der bisher erhobenen Befunde über die in *um1* vorhandenen, haplotypspezifischen Fragmente war zu erwarten, daß die in *lm1* und *lm3* fehlenden Fragmente in LEW.1UM1 vorhanden sind. Dies wurde durch den Vergleich der betreffenden RFLP-Muster in der Tat bestätigt. Eine prinzipielle Einschränkung der Analyse ergibt sich daraus, daß sich viele der Fragmente nicht zwischen den Parentalhaplotypen unterschieden. Bei in *um1* vorhandenen, nicht polymorphen Fragmenten konnte daher nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob sie aus *RT1^u* oder aus *RT1^l* stammten, oder ob der neue Haplotyp die entsprechenden Fragmente beider Parentalstämme trug.

Der Nachweis der in LEW.1LM2 fehlenden Fragmente erwies sich als schwieriger, da für die Festlegung dieser Fragmente ein wesentliches Kriterium gerade das gleichzeitige Vorkommen in beiden Parentalhaplotypen, *u* und *lv3*, war. Dementsprechend gelang nur für wenige dieser Fragmente ein sicherer Nachweis, obwohl der neue Haplotyp Banden jeder der fraglichen Fragmentlänge besaß.

Vereinzelte Fragmente fehlten sowohl *lm1* als auch *lm2*. Das 17,9 kb EcoRI-Fragment war eines von ihnen, und der neue Haplotyp *um1* besaß eine Bande der entsprechenden Länge – daher war auf jeden Fall eines der beiden in *um1* enthalten, wenn auch nicht sicher gesagt werden konnte, welches. Ein 12,2 kb EcoRV-Fragment fehlte ebenfalls in beiden Deletionsmutanten. Für dieses Fragment konnte jedoch durch die Hybridisierungen mit den *l1/3R*-Sonden nur gezeigt werden, daß *um1* zumindest das *l*-spezifische Fragment sicher besaß.

4 Diskussion

Eine Vielzahl von Untersuchungen belegen für die Klasse Ib Moleküle der Ratte eine funktionelle Bedeutung unter anderem bei der Antigenerkennung durch zytotoxische T-Zellen oder bei der Regulation der NK-Zellreaktivität. Die Zuordnung erkannter Funktionen zu einzelnen Klasse Ib Genprodukten wird jedoch erschwert durch die noch unvollständige Kenntnis des strukturellen Aufbaus der für diese Moleküle kodierenden telomeren Klasse I Region des MHC der Ratte, der *RT1.C/E*-Region. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand daher die molekulargenetische Charakterisierung der *RT1.C/E*-Region. Für die Untersuchungen wurde der Haplotyp *RT1^l* der LEW Ratte gewählt, da für ihn eine Reihe phänotypisch gut charakterisierter varianter, rekombinanter und mutanter Haplotypen zur Verfügung stand, die sich nur in der hier zu analysierenden *RT1.C/E*-Region vom Standardhaplotyp *l* unterscheiden. Diese, sämtlich als kongene Inzuchtstämme vorliegenden Haplotypen, sowie weitere, unabhängige *RT1*-Haplotypen, stellten die instrumentelle Voraussetzung für eine vergleichende Betrachtung des strukturellen Aufbaus der *RT1.C/E*-Region dar.

Besondere experimentelle Schwerpunkte bildeten die Aufklärung von Lage und Größe der genomischen Deletionen zweier mutanter *RT1^l*-Haplotypen, *lm1* und *lm3*, und die Untersuchung einer umfangreichen Genfamilie der *RT1.C/E*-Region. Die hierbei gewonnenen Kenntnisse trugen maßgeblich auch zu der im Rahmen dieser Arbeit begonnenen molekulargenetischen Charakterisierung eines neu entdeckten mutanten *RT1*-Haplotyps bei, der sich durch einen deutlichen Zugewinn an Klasse I Genen in der *RT1.C/E*-Region auszeichnete.

Im folgenden sollen die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit zusammengeführt und im Kontext neuerer Erkenntnisse über die Organisation der MHC-Regionen der Ratte, des Menschen und der Maus diskutiert werden.

4.1 Organisation des proximalen Bereiches der *RT1.C/E*-Region

Bei der Untersuchung der *RT1.C/E*-Region ist die geringe Dichte an verfügbaren genomischen Markern eine grundsätzliche Schwierigkeit. An der zentromeren Grenze der *C/E*-Region stehen Hybridisierungssonden für das *Tn α* -Gen (Tumornekrosefaktor α) sowie für das Gen der RNA-Helicase *Bat1* (HLA-B assoziiertes Transkript) zur Verfügung. Das telomer nächstgelegene Markergen ist das für den Transkriptionsfaktor *Pou5f1* (*Otf3*, *Oct-3*).

Es liegt sowohl im Menschen als auch in der Maus etwa 500 kb von *Bat1* entfernt [64, 115]. Für den *RT1ⁿ*-Haplotyp der Ratte wurde ein Abstand von etwa 340 kb gefunden [L. Walter, pers. Mitteilung]. Für den großen Bereich zwischen diesen Genen sind noch keine weiteren Marker bekannt. Nach Möglichkeit sollte daher im Rahmen der PFGE-Untersuchungen ein Restriktionsfragment gefunden werden, das diesen Bereich zwischen *Bat1* und *Pou5f1* überbrückt und so über den Vergleich zwischen LEW und den Deletionsmutanten *lm1* und *lm3* direkt die Größenbestimmung der betreffenden Deletionen ermöglichte. Entsprechend gelten die ersten PFGE-Experimente der Suche nach einer geeigneten Restriktionsendonuklease, die, in Kombination mit den genannten Hybridisierungssonden, möglichst große und informative Fragmente erzeugt. Ein derartiges Fragment wird jedoch mit keinem der getesteten Enzyme (MluI, SfiI, XhoI, ClaI, SmaI, SalI) erhalten, so daß die Analyse auf kürzeren Fragmenten aufgebaut werden muß, die nur Teilabschnitte des Segmentes zwischen *Bat1* und *Pou5f1* darstellen.

Noch innerhalb der Klasse III-Region, an der Grenze zu *RT1.C/E*, liegt das Gen für den Tumornekrosefaktor *Tnf α* [116]. Eine *Tnf α* -Sonde hybridisiert in den *RT1*-Haplotypen *l*, *u* und *n* mit einem polymorphen MluI-Fragment. In allen untersuchten Haplotypen hybridisiert die Sonde für einen weiteren Nicht-Klasse I-Marker, dem Gen der RNA-Helikase *Bat1*, mit den jeweils gleichen haplotypspezifischen Fragmenten, wie die *Tnf α* -Sonde. Der *RT1ⁿ*-Haplotyp der Stämme BN und LEW.1N weist dabei das kürzeste dieser polymorphen Fragmente mit einer Länge von 50 kb auf. Die Gene *Tnf α* und *Bat1* sind also in diesem Haplotyp nicht weiter als 50 kb voneinander entfernt. Für den *RT1^u*-Haplotyp des Stammes LEW.1W wurde anhand überlappender Cosmidklone, die beide Markergene in einem etwa 70 kb umfassenden Grenzbereich zwischen der Klasse III- und der *RT1.C/E*-Region enthielten, bereits ein ähnlicher Abstand von 40 kb bestimmt [117]. Der Abstand beider Gene in der Ratte entspricht demnach denen in der Maus und im Menschen [99, 118, 119].

Das *Bat1*-Gen wurde zuvor in zwei weiteren Klasse I Cosmid-Clustern unterschiedlicher *RT1*-Haplotypen identifiziert, dem Haplotyp *av1* und dem auch in dieser Arbeit untersuchten *l*-Haplotyp der Lewis-Ratte [84]. Beide Cluster enthalten in einem Abstand von etwa 10 kb zu *Bat1* das erste Klasse I Gen. In der Maus beträgt die Entfernung zwischen *Bat1* und *H-2D*, dem ersten Klasse I Gen der telomeren Klasse I-Region, ebenfalls 10 kb. Aufgrund dieser

Analogie wurden die beiden Cosmid-Cluster bereits bisher an den Anfang der *RT1.C/E*-Region kartiert. Die vorliegenden Befunde bestätigen die Richtigkeit dieser Annahme.

Die Sonden für drei weitere Markergene der *RT1.C/E*-Region, *Pou5f1*, *Tcf19* und *S*, hybridisieren im *l*-Haplotyp übereinstimmend mit zwei *MluI*-Fragmenten bei 600 und 520 kb. Demgegenüber treten mit der *Pou5f1*-Sonde im *u*-Haplotyp zwei andere *MluI*-Fragmente mit einer Länge von 70 und 390 kb auf. Der rekombinante Haplotyp *r14* zeigt mit dieser Sonde das Muster des *l*-Haplotyps, und in *r15* hybridisieren die gleichen Banden wie im *u*-Haplotyp. Der Befund zeigt, daß *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* im MHC der Ratte innerhalb der *C/E*-Region und hier in relativer Nachbarschaft zueinander liegen. Eine Erklärung für das Auftreten von zwei Banden mit diesen drei Einzellokussonden liegt in einer unvollständigen Verdauung der DNA aufgrund einer verstärkten Methylierung dieses Bereiches der *RT1.C/E*-Region.

Im MHC des Menschen kartieren die drei Marker in den Intervall zwischen *HLA-C* und *HLA-E*, im murinen *H-2*-Komplex liegen sie zwischen der *H-2Q*- und der *H-2T*-Region [64, 115]. Für *Pou5f1* und das *S*-Gen der Ratte wurde bereits anhand von RFLP-Analysen eine Lage innerhalb der *RT1.C/E*-Region nachgewiesen [84]. So kartierte ein *SspI*-Polymorphismus zwischen den Haplotypen *l* und *u* das *Pou5f1*-Gen durch den Vergleich der polymorphen Banden in den rekombinanten Haplotypen *r14* und *r15* in die *RT1.C/E*-Region. Es liegt dabei klar außerhalb der genomischen Deletionen der drei mutanten Haplotypen *lm1*, *lm2* und *lm3*. Für das *S*-Gen wurde zwischen den Haplotypen *l* und *u* ein Polymorphismus mit dem Restriktionsenzym *NcoI* gefunden. Die Lage des *S*-Gens konnte über diesen Polymorphismus innerhalb der *C/E*-Region in den Bereich zwischen den Rekombinationspunkten von *lm2* und *r38* kartiert werden. Durch die vorliegenden Befunde wird diese Kartierung bestätigt. Darüber hinaus zeigen sie, daß *Tcf19*, wie im Menschen und in der Maus, auch in der Ratte im gleichen Bereich wie *Pou5f1* und das *S*-Gen lokalisiert ist.

Wie ist die relative Abfolge dieser drei benachbarten Marker in der *RT1.C/E*-Region? Im humanen *HLA*-Komplex und dem MHC der Maus besitzen die drei Marker übereinstimmend die Reihenfolge *Pou5f1–Tcf19–S*. Bei beiden Spezies liegt *Tcf19* in geringem Abstand telomer zu *Pou5f1*, während das *S*-Gen im Menschen 60 kb telomer von *POU5F1* lokalisiert ist [101, 103, 120-122]. Die bisherigen Befunde in der Ratte geben keinen Hinweis auf die Reihenfolge dieser drei Marker. Daher bedarf es noch weiterer Experimente, um diese Frage für die Ratte endgültig zu klären.

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels PFGE-Analyse durchgeführte Untersuchung des *l*-mutanten *RT1*-Haplotyps *lm1* führt zu der Kartierung seiner Deletion innerhalb der *RT1.C/E*-Region. Mit der Sonde für den Marker *Pou5f1* hybridisieren in *lm1* nicht die beiden aus dem *l*-Haplotyp bekannten *SfiI*-Fragmente, sondern zwei jeweils um etwa 40 kb längere Fragmente bei 140 und 160 kb. Dieser Befund kartiert die *lm1*-Deletion klar in die Nähe von *Pou5f1*. Eine *SfiI*-Schnittstelle ist durch die Deletion in *lm1* verlorengegangen und durch eine neue Schnittstelle am anderen Ende der Deletion ersetzt worden. Der Abstand der Deletion zu *Pou5f1* wird durch das kürzeste Fragment im *l*-Haplotyp, das diesen Marker trägt, auf höchstens 100 kb bestimmt.

Mit der Sonde für das *S*-Gen hybridisieren in *lm1* zwei *SfiI*-Fragmente gleicher Länge wie im *l*-Haplotyp. Die Deletion liegt also auf der dem *S*-Gen entgegengesetzten Seite von *Pou5f1*. Wird für die Ratte die gleiche Anordnung der drei Markergene *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* angenommen, wie in der Maus und im Menschen, kartiert die *lm1*-Deletion zentromer von *Pou5f1*. Sie liegt daher zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1*, im proximalen Bereich der *RT1.C/E*-Region.

Ein unterstützendes Argument für die Lokalisation der *lm1*-Deletion zwischen *Bat1* und *Pou5f1* ist die Feststellung, daß an beiden Grenzen der *lm1*-Deletion Klasse I-Gene lokalisiert sind [112]. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind die distal von *S* nächstgelegenen Klasse I Gene der Ratte die Gene *RT.BMI*, *RT1.N* und *RT1.O*. In PFGE-Untersuchungen mit einer *RT1.N*-spezifischen Sonde und einer Sonde für den zu diesen Genen benachbarten Marker *Gna-rs1* wurde kein Unterschied zwischen dem mutanten *lm1*-Haplotyp und seinem parentalen *l*-Haplotyp nachgewiesen. Somit betrifft die Deletion nicht die distale *RT1.C/E*-Region und ihre Kartierung zwischen *Bat1* und *Pou5f1* wird bestätigt.

Die mit den Sonden für *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* hybridisierenden *MluI*-Fragmente ergeben zusätzlich Hinweise auf die Größe der Deletion. Sie sind in *lm1* mit 350 und 420 kb jeweils um etwa 170 kb kürzer als die korrespondierenden Fragmente im parentalen *l*-Haplotyp, was auf einen Verlust eines entsprechend großen, genomischen Bereiches in der Mutante zurückzuführen ist. Die vergleichende Analyse der Klasse I positiven Fragmente beider Haplotypen zeigt, daß der in *lm1* fehlende Bereich sogar noch um einiges größer ist. Gegenüber der LEW-Ratte fehlen der *lm1*-Mutante drei Klasse I Fragmente bei 30, 80 und 250 kb. Zusammen mit dem um 170 kb verkürzten, *Pou5f1*-tragenden *MluI*-Fragment ergibt

sich daraus rechnerisch ein Verlust von über 500 kb. Dieser Wert liegt erheblich über der bisherigen, anhand von RFLP-Untersuchungen vorgenommenen Schätzung von etwa 100 kb für die Größe der Deletion [75, 112].

Die PFGE-Analyse des mutanten *RT1*-Haplotyps *lm3* zeigt, daß diesem gegenüber *l* ein Klasse I positives MluI-Fragment bei 350 kb fehlt. Gleichzeitig treten in *lm3* zwei neue Banden bei 120 und 150 kb auf, die im Muster des *l*-Haplotyps nicht vorkommen. Aus der Differenz zwischen dem fehlenden und den beiden neuen Fragmenten ergibt sich die Größe der *lm3*-Deletion zu etwa 80 kb. Damit ist auch sie größer als bisher angenommen.

Da nach den bisherigen Erkenntnissen die *lm3*-Deletion vollständig innerhalb des in *lm1* deletierten Bereiches der *RT1.C/E*-Region liegt, sollte das beschriebene 350 kb MluI-Fragment auch bei *lm1* fehlen [113]. Im Muster der Klasse I positiven Fragmente nach MluI-Verdauung tritt jedoch in *lm1* bei 350 kb ebenfalls eine deutliche Bande auf. Aus den Untersuchungen des Nicht-Klasse I-Marker *Pou5f1* ist aber bekannt, daß dieser im *lm1*-Haplotyp auf zwei MluI-Fragmenten von 350 und 420 kb liegt, während *lm3* die gleichen Fragmente bei 520 und 600 kb aufweist, wie der *l*-Haplotyp. Alle diese Banden treten auch nach Hybridisierung mit der Klasse I-Sonde pWW6.3 auf. Zufällig stimmt in *lm1* die Länge des kürzeren der beiden *Pou5f1*-Fragmente mit der des fehlenden 350 kb Fragmentes überein, und es nimmt daher im Fragmentmuster seinen Platz ein. Die Hybridisierungsergebnisse mit einer zweiten Klasse I-Sonde, die aus dem 3' untranslatierten Bereich des *11/3R*-Gens stammt, bestätigen diese Annahme. Mit dieser Sonde hybridisieren im *l*-Haplotyp mit Ausnahme eines 20 kb MluI-Fragmentes alle zuvor mit der pWW6.3 nachgewiesenen Fragmente. So auch das Klasse I positive 350 kb Fragment. In *lm1* hybridisieren dagegen die beiden *Pou5f1*-tragenden MluI-Fragmente nicht mit dieser Sonde, und es zeigt sich deutlich das Fehlen der fraglichen Bande bei 350 kb. Dieses Fragment muß also auch bei der Berechnung der Deletionsgröße von *lm1* berücksichtigt werden. Rechnerisch ergibt sich daher für diese Mutante ein Verlust von etwa 880 kb der *RT1.C/E*-Region.

Die *lm1*-Deletion liegt aufgrund der hier vorgestellten Befunde in dem Intervall zwischen *Bat1* und *Pou5f1*. Der Abstand zwischen diesen beiden Markern im *l*-Haplotyp entspräche daher mindestens der berechneten Größe der *lm1*-Deletion. Im Hinblick auf Daten anderer Gruppen, die zum Beispiel aus der Analyse überlappender PAC-Klone für die BN-Ratte (*RT1ⁿ*) einen Abstand zwischen *Bat1* und *Pou5f1* von etwa 340 kb erhalten, erscheint der hier für den *l*-Haplotyp gefundene Wert sehr groß [L. Walter, pers. Mitteilung]. Die Hybridisierung

mit den Sonden für die Nicht-Klasse I-Marker *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* gibt einen Hinweis darauf, daß in diesem Bereich der *RT1.C/E*-Region von den Restriktionsenzymen MluI und SfiI nur unvollständig geschnitten wird. Da diese Restriktionsenzyme methylierungssensitiv sind, also methylierte DNA nicht schneiden, kann als Ursache für diese unvollständige Verdauung der DNA eine differentielle Methylierung einzelner Schnittstellen angenommen werden [123, 124]. Was spricht jedoch für eine differentielle DNA-Methylierung in dem in *Im1* deletierten Bereich der *RT1.C/E*-Region?

Die Methylierung von DNA erfolgt häufig am Cytosinrest von CpG-Dinukleotiden und wird durch spezielle Methyltransferasen vermittelt. Das CpG-Dinukleotid ist in prokaryontischer DNA etwa in der statistisch erwarteten Häufigkeit anzutreffen (1 von 16) und liegt unmethyliert vor, während es in Vertebratengenomen in einer deutlich geringeren Frequenz enthalten ist und hier häufig methyliert vorliegt. Die wegen dieser CpG-Suppression in Vertebraten reduzierte Häufigkeit des CpG-Motivs ist ein möglicher Grund für die beschriebene Effizienz von synthetischen CpG-Oligonukleotiden bei ihrem Einsatz als Adjuvantien [125, 126].

In Vertebraten finden sich CpG-reiche Regionen häufig im 5' Bereich von Genen und stellen dort Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine dar [127]. Der mutationsbedingte genetische Ausfall sowohl der *de novo* Methyltransferase DNMT3 β als auch des Methyl-CpG-bindenden Proteins MeCP2 wurde mit verschiedenen Krankheitsbildern des Menschen assoziiert [128]. Die Cytosinmethylierung in CpG-Motiven führt häufig zu einer abgeschwächten Transkription des betreffenden Gens. Für MHC Klasse I Gene wurde dies unter anderem durch Untersuchungen an der humanen Trophoblasten-Zelllinie JAR gezeigt [129]. Allerdings spielen gerade für die Kontrolle der Klasse I Expression noch eine Reihe anderer Faktoren eine wichtige Rolle. Dies zeigten zum Beispiel weiterführende Arbeiten der gleichen Gruppe, bei denen der Einfluß der DNA-Methylierung auf die Expression von MHC Klasse I Molekülen in den humanen Trophoblasten-Zelllinien JAR und JEG-3 im Vergleich zu frisch isolierten Trophoblastenzellen untersucht wurde [130]. Als ein weiterer, möglicher Regulationsmechanismus wird hier eine Kontrolle auf der Ebene der mRNA-Stabilität diskutiert, ähnlich wie dies bereits für MHC Klasse II Moleküle gezeigt wurde [131].

Weitere Hinweise auf die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Regulation der Genexpression erbrachte die Analyse einer Vielzahl von kultivierten Zelllinien im Hinblick auf

den Methylierungsgrad der CpG-Inseln unterschiedlicher ihrer Gene [132]. Die hierbei in allen untersuchten Linien festgestellte *de novo* Methylierung ausschließlich der gewebespezifischen Gene und der meisten MHC Klasse I Gene, führte stets zu einer Inaktivierung der betreffenden Gene. Die *de novo* Methylierung ist daher ein möglicher Grund für den bekannten, allmählichen Verlust differenzierter Zellfunktionen bei über einen längeren Zeitraum kultivierten Zellen.

Neben ihrer Rolle für die Regulation der Genexpression wird für die CpG-Motive im 5' Bereich von Klasse I Genen noch eine andere Bedeutung diskutiert. Bereits Mitte der achtziger Jahre wurde bei der Analyse einer Reihe von humanen und murinen Klasse I Gensequenzen festgestellt, daß die hierbei beobachteten Nukleotidunterschiede nicht zufällig und an voneinander unabhängigen Positionen auftraten, sondern stets in zusammenhängenden Gruppen und nahezu ausschließlich am CpG-reichen 5' Ende der Klasse I Sequenzen [133, 134]. Aus diesen Befunde wurde geschlossen, daß der Genkonversion eine wichtige Funktion bei der Entstehung der Vielzahl von Klasse I Genen und Allelen beider Spezies zukommt. Neuere Untersuchungen bestätigen diese Theorie. Bei der Untersuchung von 32 Sequenzen humaner und muriner Klasse I Gene wurde festgestellt, daß all diejenigen Gene, die an Genkonversionen beteiligt waren, eine erhöhte Zahl an CpG-Dinukleotiden aufweisen [135]. Andere Gene, für die keine Beteiligung an Genkonversionen angenommen wird, zeigten eine deutliche CpG-Suppression.

Bei einer RFLP-Analyse der Klasse I Gene der *RTI*-Haplotypen *u* und *n* mit den in ihrer Methylierungsempfindlichkeit unterschiedlichen, isoschizomeren Restriktionsenzymen *MspI* und *HpaII*, wurden deutliche haplotypspezifische und organspezifische Unterschiede im Methylierungsgrad gefunden [136, 137]. So waren die Erkennungssequenzen beider Enzyme im *u*-Haplotyp zu 42% und im *n*-Haplotyp zu 51% methyliert. Zudem zeigten sich deutliche Methylierungsunterschiede zwischen Leber und Milz des *u*-Haplotyps, die auf eine differentielle Expression der betreffenden Klasse I Gene hindeutete.

Auch der in dieser Arbeit vornehmlich analysierte *l*-Haplotyp der Lewis-Ratte wurde auf das Vorliegen von CpG-Inseln untersucht [112]. Dabei konnte gezeigt werden, daß der im Bereich der *ImI*-Deletion liegende Cosmidcluster I eine deutlich höhere Dichte an CpG-Motiven aufweist, als die in anderen Abschnitten der *RTI.C/E*-Region liegenden Cosmidcluster. In den 5' Bereichen jedes der in Cluster I lokalisierten Klasse I Gene wurden CpG-Motive nachgewiesen.

Nimmt man für den *l*-Haplotyp einen vergleichbaren Anteil methylierter CpG-Dinukleotide an, wie er für die Haplotypen *u* und *n* gezeigt wurde, liegt in ihm etwa die Hälfte dieser Motive methyliert vor [137]. Methylierungsempfindliche Restriktionsendonukleasen wie MluI, SfiI oder ClaI wären dann bei etwa der Hälfte der potentiellen Erkennungssequenzen nicht in der Lage, die DNA zu schneiden. Eine differentielle Methylierung der betreffenden Schnittstellen, entweder auf den beiden Schwesterchromosomen oder in unterschiedlichen Zellpopulationen der zur DNA-Präparation verwendeten Gewebe, hätte ein komplexes Muster von Restriktionsfragmenten zur Folge, in dem vollständig geschnittene DNA neben lediglich partial verdauter DNA läge. Die differentielle Methylierung von CpG-Motiven ist wahrscheinlich der Grund für die mit den Einzellokussonden der Nicht-Klasse I-Marker *Pou5f1*, *Tcf19* und *S* nachgewiesenen Doppelbanden. Und auch bei der Untersuchung der Klasse I positiven MluI-Fragmente erklärte die Annahme einer differentiellen Methylierung im Bereich verschiedener Schnittstellen, wieso in *lm1* gegenüber *l* so viele Fragmente fehlen.

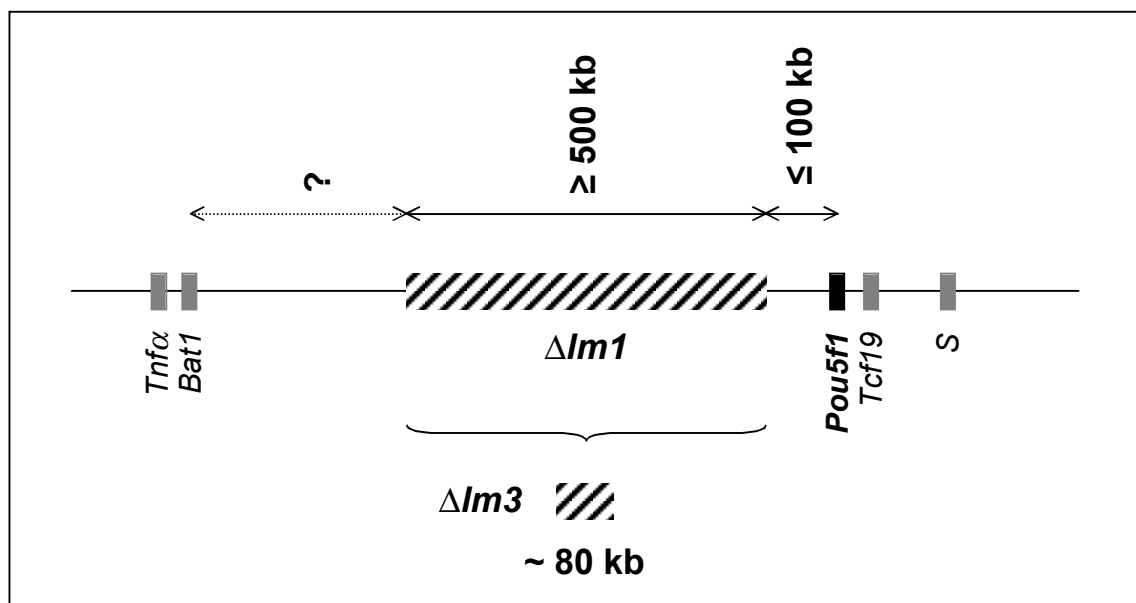


Abbildung 4-1 Schematische Zusammenfassung der Kartierung der genomischen Deletionen in den mutanten Haplotypen *RT1^{lm1}* und *RT1^{lm3}*. Die *lm1*-Deletion hat eine Größe von etwa 500 kb und liegt im proximalen Bereich der *RT1.C/E*-Region zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1*. Die telomere Grenze der Deletion ist maximal 100 kb von *Pou5f1* entfernt. Die *lm3*-Deletion hat eine Ausdehnung von etwa 80 kb und liegt vollständig innerhalb der *lm1*-Deletion.

Addiert man die Längen von drei der im *lm1*-Haplotyp fehlenden Fragmente bei 30, 80 und 250 kb, so erhält man mit 360 kb einen Wert, der, im Rahmen der bei PFGE-Längenbestimmungen möglichen Genauigkeit, der Länge des vierten, in *lm1* und *lm3* fehlenden Fragments bei 350 kb entspricht. Werden für das 350 kb Fragment zwei interne, differentiell methylierte MluI-Schnittstellen postuliert, könnten daher die kleineren Fragmente alle in dem großen Fragment enthalten sein. In diesem Fall entstammen die Fragmente bei 30, 80 und 250 kb dem gleichen genomischen Bereich wie das 350 kb Fragment und dürfen bei der Berechnung der Deletionsgröße nicht mitgezählt werden. Unter Berücksichtigung des in *lm1* um 170 kb verkürzten *Pou5f1*-tragenden MluI-Fragments ergibt sich die Größe der *lm1*-Deletion dann zu etwa 520 kb. Gegenüber einem Verlust von fast 900 kb, der sich aus der Addition der Längen aller fehlenden Fragmente ergibt, erscheint dieser Wert wahrscheinlicher.

Die die Deletion flankierenden Marker *Bat1* und *Pou5f1* liegen nach dieser Rechnung im *l*-Haplotyp wenigstens etwa 600 kb auseinander. In der Ratte scheint dieser Abstand daher zwischen den einzelnen Haplotypen sehr variabel zu sein. Er liegt aber in der gleichen Größenordnung wie im Menschen und in der Maus, wo er jeweils auf etwa 500 kb bestimmt wurde [64, 115].

4.2 Die *II/3R*-Familie

Zahlreiche Untersuchungen belegten die funktionelle Bedeutung der *RT1.C/E*-Region. Die Gene dieser Region kodieren außer für gering polymorphe Klasse Ib Genprodukte wie *RT1.L* und *RT1.R* auch für das polymorphe *RT1.C*-Molekül oder die erst vor kurzem beschriebene polymorphe *RT1-U*-Familie [74, 82, 138]. Bei der Untersuchung der Suszeptibilität von Zielzellen des mutanten Haplotyps *RT1^{lm1}* gegenüber NK-Zellen unterschiedlicher Alloreaktivität wurde der Verlust sowohl inhibierender als auch aktivierender Strukturen festgestellt [91, 92]. Die *RT1.C/E*-Region enthält demnach eine sowohl strukturell als auch funktionell sehr heterogene Gruppe von Klasse Ib Genen, die jedoch aufgrund von Sequenzhomologien in unterschiedliche Gruppen bzw. Familien eingeteilt werden können.

Eine dieser MHC Klasse Ib Genfamilien der Ratte wird durch cDNA-Sonden aus dem Klasse Ib Gen *II/3R* definiert [78]. Mit spezifischen PCR-Primern für dieses exprimierte Klasse Ib Gen war klar gezeigt worden, daß es in dem mutanten *RT1*-Haplotyp *lm1* fehlt. Im Rahmen der Untersuchung der genomischen Deletion dieses Haplotyps sollte daher auch die

weitere molekulargenetische Charakterisierung der *I1/3R*-Familie erfolgen. Dabei stand die Frage nach Anzahl und Lokalisation der einzelnen *I1/3R*-Gene im Vordergrund.

Für die Untersuchungen wurde eine der Besonderheiten von *I1/3R* genutzt. Dieses Gen zeichnet sich durch einen charakteristischen und im Vergleich zu anderen Klasse I Genen besonders ausgedehnten 3' untranslatierten Bereich (3'utr) aus. In der Regel besitzen die 3' untranslatierten Regionen von MHC Klasse I Genen der Maus und der Ratte einen hochkonservierten, nichtkodierenden Anfangsbereich von etwa 320 bp Länge, der als NC1 (*engl. non coding region 1*) bezeichnet wird [139]. An diesen schließt sich ein meist um 130 bp langer, weniger konservierter und häufig genspezifischer, nichtkodierender Abschnitt NC2 an. In *I1/3R* ist der NC2-Bereich mit einer Länge von über 1 kb ungewöhnlich ausgedehnt [78]. Diesem Bereich waren die cDNA-Sonden entnommen, mit denen die Definition der *I1/3R*-Genfamilie erfolgte. Aus der gleichen Region wurden für die vorliegende Arbeit verschiedene PCR-Primer gewählt, mit denen einerseits direkte PCR-Analysen vorgenommen wurden und die andererseits zu der Herstellung der Hybridisierungssonde NC2/490 aus der NC2-Region von *I1/3R* dienten. Mit dieser Sonde erfolgte dann die weitere Charakterisierung der Genfamilie.

Mit den NC2/490-PCR-Primern, die aus dem *I1/3R*-Gen ein 490 bp Fragment der NC2-Region amplifizieren, werden in nahezu allen untersuchten *RT1*-Haplotypen zwei Subsets der *I1/3R*-Familie nachgewiesen, die sich in der Länge ihrer PCR-Produkte unterscheiden. Neben dem 490 bp Fragment wird aus genomischer DNA der *RT1*-Haplotypen *a*, *b*, *c*, *d*, *k*, *l* und *u*, der varianten Haplotypen *av1*, *dv1*, *lv*, *lv1*, *lv2*, *lv3* und *uv4*, sowie der rekombinanten Haplotypen *r14*, *r15*, *r36*, *wr1* und *wr2* stets ein zweites Produkt mit einer Länge von 450 bp amplifiziert. Dagegen tritt in den *l*-mutanten Haplotypen *lm1* und *lm2* nur jeweils eines dieser beiden Fragmente auf. In *lm1* wird ausschließlich das kürzere Produkt amplifiziert und *lm2* zeigt nur das längere Fragment. Eine Erklärung für diesen Befund ist, daß die beiden in diesem PCR-System nachgewiesenen Subsets der *I1/3R*-Familie in voneinander getrennten Bereichen der *RT1.C/E*-Region liegen, die durch die genomischen Deletionen der Haplotypen *lm1* und *lm2* markiert werden.

Die Sequenzanalyse einzelner PCR-Produkte beider Mutanten bestätigt, daß es sich bei ihnen um Fragmente aus den 3'utr *I1/3R*-ähnlicher Gene handelt. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen zeigt, daß ein definiertes 44 bp-Motiv die Ursache des beobachteten

Längenunterschieds zwischen den PCR-Produkten beider Mutanten darstellt. Die nachfolgende Hybridisierung der PCR-Produkte aus einer Reihe von *RTI*-Haplotypen mit der aus diesem Motiv abgeleiteten, synthetischen Oligonukleotid-Sonde $\Delta 44$ belegt, daß das Motiv in allen langen PCR-Fragmenten enthalten ist und in den kurzen fehlt. Aufgrund dieses Befundes wird postuliert, daß das $\Delta 44$ -Motiv den definierten Unterschied beider Subsets der *I1/3R*-Familie darstellt.

Die Analyse einer Reihe von MHC Klasse I positiven Cosmidklonen der Lewis-Ratte, die in früheren Arbeiten isoliert und charakterisiert worden waren [112] macht jedoch deutlich, daß das $\Delta 44$ -Motiv zwar eine Unterscheidung von zwei Subsets der *I1/3R*-Familie ermöglicht, die jeweiligen Gene aber nicht ausschließlich in den Bereichen der Deletionen von *Im1* und *Im2* lokalisiert sind, wie die PCR-Befunde vermuten ließen. Auf mehreren Cosmiden der proximalen *RTI.C/E*-Region lassen sich durch die Hybridisierung mit der NC2/490- und der $\Delta 44$ -Sonde insgesamt sieben *I1/3R*-ähnliche Gene nachweisen, von denen vier das $\Delta 44$ -Motiv aufweisen. Nur zwei dieser Gene kartieren in den Bereich der *Im1*-Deletion, und eines davon ist *I1/3R* selbst. Alle Fragmente, die mit der NC2/490-Sonde darstellbar sind, hybridisieren zusätzlich mit der Klasse I-Sonde pWW6.3 und repräsentieren daher Klasse I Gene mit homologen Sequenzen zur NC2-Region von *I1/3R*. Hinweise auf *I1/3R*-ähnliche Gene in der distalen *RTI.C/E*-Region werden nicht gefunden. Alle Cosmide aus diesem Bereich sind in der Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde negativ.

Über die Gesamtzahl der *I1/3R*-Gene in den einzelnen Haplotypen, sowie die Anzahl der von den jeweiligen Deletionen betroffenen Genen dieser Familie geben RFLP-Analysen genomischer DNA unterschiedlicher *RTI*-Haplotypen Auskunft. In allen untersuchten Haplotypen (*a*, *b*, *c*, *d*, *k*, *l*, *lv1*, *lv3*, *n*, *u*, *uv4*, *wr1*, *wr2*, *av1*, *r14* und *r15*) sind mit der NC2/490-Sonde nach EcoRI-Verdauung mehrere Fragmente nachweisbar. Ihre Anzahl variiert zwischen den einzelnen Haplotypen in einem Bereich von 7 Fragmenten in F344 (*RTI^{lv1}*) und 8 in LEW.1N (*RTIⁿ*), über 13 Fragmente in den Stämmen LEW.1A(*RTI^a*) und LEW.1K(*RTI^k*) bis hin zu 17 Fragmenten in LEW (*RTI^l*) und 18 in LEW.1U (*RTI^u*). Die unterschiedliche Anzahl der *I1/3R*-Gene in den einzelnen Haplotypen zeigt, daß diese Familie vermutlich ähnlichen haplotypspezifischen Unterschieden unterliegt, wie es für verschiedene Klasse Ib-Familien der murinen *H-2Q*- und *H-2T*-Region oder für die Gruppe der *RTI.N* und *RTI.O* Gene der Ratte beschrieben wurde [41, 64-67, 83, 140, 141]. Es gibt neben einigen gering

polymorphen Banden, die in einer Reihe von Haplotypen vorhanden sind und die für eine Konservierung der entsprechenden Sequenzen sprechen, auch haplotypspezifische Fragmente, die auf einzelne polymorphe Mitglieder innerhalb der *11/3R*-Familie hindeuten. In den untersuchten Haplotypen hybridisiert etwa die Hälfte aller mit pWW6.3 nachweisbaren Klasse I Fragmente auch mit der NC2/490-Sonde.

Die Analyse der *a/u*-rekombinanten Haplotypen *wr1* (A^uB/D^uCE^a) und *wr2* (A^uB/D^aCE^a) liefert weitere Belege für die Lokalisation der *11/3R*-Familie innerhalb der *RT1.C/E*-Region. Beide Haplotypen zeigen nach Hybridisierung mit NC2/490 mit Ausnahme eines einzigen *RT1^u*-spezifischen EcoRI-Fragmentes bei 26 kb ausschließlich das Muster des *a*-Haplotyps. Dieser Hinweis auf eine mit der NC2/490-Sonde hybridisierende Sequenz in der *RT1.A*-Region des *u*-Haplotyps wird auch bei dem Vergleich der *u/l*-rekombinanten Haplotypen *r14* (A^uB/D^uCE^l) und *r15* (A^lB/D^lCE^u) gefunden. Mit drei Enzymen (EcoRV, HindIII und XbaI) treten in der RFLP-Analyse einzelne NC2/490-positive Fragmente auf, die in die *RT1.A^u*-Region kartieren. Da der *u*-Haplotyp nur einen Klasse Ia-Genort in seiner *RT1.A*-Region besitzt, ist es jedoch unwahrscheinlich, daß es sich bei der hier mit der NC2/490-Sonde hybridisierenden Sequenz um ein Klasse I Gen der *11/3R*-Familie handelt [142]. Vermutlich handelt es sich um eine unspezifische Kreuzhybridisierung mit einem zufällig ähnlichen Sequenzfragment. Die übrigen in diesen Haplotypen nachgewiesenen Fragmente kartieren in die *RT1.C/E*-Region.

In den Hybridisierungsmustern des mutanten Haplotyps *lm1* fehlen gegenüber seinem Parentalhaplotyp *l* etwa 100 kb der Klasse I positiven Fragmente. Durch die genomische Deletion ist *lm1* demnach eine größere Anzahl von Klasse I Genen verloren gegangen. Von diesen Genen gehören 10 der *11/3R*-Familie an, wie die Hybridisierungen mit den Sonden NC2/490 und 11/3-2 klar belegen. Wie viele dieser *11/3R*-Gene das $\Delta 44$ -Motiv aufweisen, läßt sich anhand der Hybridisierungen mit der $\Delta 44$ -Sonde nicht eindeutig klären, da bei den unterschiedlichen Restriktionsverdauungen das Verhältnis zwischen $\Delta 44$ -positiven und negativen *11/3R*-Fragmente stark variiert. Sicher ist allerdings, daß in *lm1* Gene beider Untergruppen fehlen.

Es zeigt sich andererseits, daß *lm1* noch eine Reihe von Fragmenten besitzt, die sowohl mit pWW6.3 als auch mit wenigstens einer der *11/3R*-Sonden NC2/490 oder 11/3-2 hybridisieren. Je nach betrachteter Restriktionsverdauung gehören 8 bis 11 Klasse I Gene der *11/3R*-Familie

an. Aufgrund der Hybridisierung mit $\Delta 44$ lassen sich bei diesen Fragmenten zwei annähernd gleich große Untergruppen unterscheiden. In *lm1* sind also weiterhin sowohl $\Delta 44$ -positive als auch $\Delta 44$ -negative *11/3R*-Gene vorhanden.

Eine wichtige Frage bei der Untersuchung sowohl der *11/3R*-Familie, als auch der genomischen Deletion des *lm1*-Haplotyps besteht darin, ob das der Familie den Namen gebende, auf Cosmid 59 liegende Klasse Ib Gen *11/3R* in *lm1* fehlt oder nicht. Für zwei auf Cosmid 59 gelegene Klasse I Gene, die beide nicht zur *11/3R*-Familie gehören, wurde bereits bei der ursprünglichen Beschreibung der Cosmidklone klar gezeigt, daß sie in *lm1* fehlen [112]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhalten Befunden stimmen mit diesem Ergebnis überein. Sie stehen jedoch der Aussage entgegen, das *11/3R*-Gen sei in *lm1* nicht deletiert. Das *11/3R* tragende EcoRI-Fragment von Cosmid 59 ist zwar scheinbar auch im *lm1*-Haplotyp vorhanden, die densitometrische Analyse der entsprechenden Bande des parentalen *l*-Haplotyps belegt hier jedoch das Auftreten mehrerer komigrierender, Klasse I positiver Fragmente mit gegenüber den *11/3R*-Sonden übereinstimmendem Hybridisierungsverhalten. In *lm1* fehlt wenigstens eines dieser Fragmente. Die in *lm1* vorhandene Bande widerspricht also nicht den übrigen Befunden, nach denen das *11/3R*-Gen in *lm1* fehlt ([78] und eigene Daten). Es besagt lediglich, daß es außerhalb der *lm1*-Deletion noch zumindest ein weiteres, zu *11/3R* homologes Gen gibt, das auf einem EcoRI-Fragment gleicher Länge liegt. Zusammen mit den übrigen in dieser Arbeit vorgestellten Befunde ist davon auszugehen, daß das *11/3R*-Gen in LEW.1LM1 deletiert ist.

Im Gegensatz zu den umfangreichen Unterschieden zwischen *lm1* und *l* fehlen bei einer weiteren *RTI*-Mutante, BN.1L (*lm3*), nur maximal drei Klasse I Fragmente, die alle ebenfalls in *lm1* fehlen. Dieser Befund bestätigt die in den bisherigen Untersuchungen zur Lage der *lm3*-Deletion vorgeschlagene Lokalisation innerhalb des bei *lm1* deletierten Abschnittes der *RTI.C/E*-Region [113]. Auch die hier gefundene Anzahl der deletierten Klasse I Gene unterstützt die früheren Ergebnisse. Darüber hinaus zeigen die Hybridisierungen mit den *11/3R*-Sonden, daß von den drei in *lm3* fehlenden Klasse I Genen zwei der *11/3R*-Familie angehören. Beide tragen das $\Delta 44$ -Motiv.

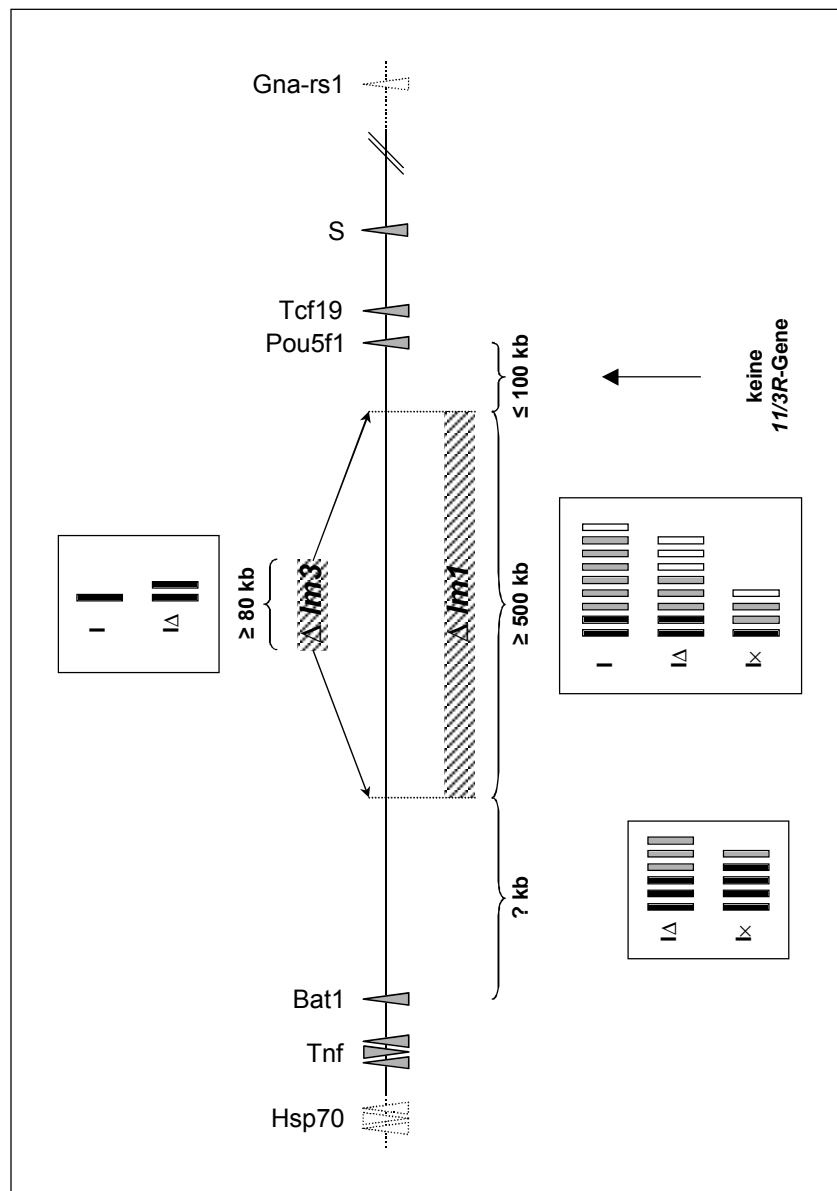


Abbildung 4-2 Kartierung der 11/3R-ähnlichen Klasse I Gene im $RT1^l$ -Haplotyp anhand der fehlenden und vorhandenen Fragmente der mutanten $RT1$ -Haplotypen $im1$ und $im3$. Eingezeichnet ist die in dieser Arbeit bestimmte Größe der Deletionen und ihre Lage relativ zu den flankierenden Markergenen *Bat1* und *Pou5f1*. In den Kästen sind die jeweils in den entsprechenden Bereichen nachgewiesenen Klasse I Gene (I), 11/3R-ähnliche Gene mit $\Delta 44$ -Motiv tragen (I Δ) und die 11/3R-Gene ohne $\Delta 44$ -Motiv (I \times) zusammengestellt. Hierbei steht ein Balken für jeweils ein Gen. Ein schwarzer Balken symbolisiert ein sicher hier lokalisiertes Gen, ein grauer Balken ein wahrscheinlich hier liegendes und ein möglicherweise in dem jeweiligen Bereich lokalisiertes Gen wird durch einen weißen Balken dargestellt. In dem Bereich zwischen *im1*-Deletion und *Pou5f1* liegen keine 11/3R-ähnlichen Gene, da das entsprechende MluI-Fragment nicht mit der NC2/490-Sonde hybridisiert. Die in *im1* noch vorhandenen Klasse I Gene, die nicht zur 11/3R-Familie gehören, können aufgrund der vorliegenden Befunde nicht in einen der Bereiche proximal oder distal der Deletion kartiert werden. Die 11/3R-ähnlichen Gene liegen nicht geclustert in bestimmten Bereichen sondern verteilen sich zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1* über die proximale *RT1.C/E*-Region.

Die in dieser Arbeit erfolgte PCR-Analyse des mutanten *RT1*-Haplotyps *lm2* macht deutlich, daß dieser Mutante wenigstens ein Gen der *11/3R*-Familie fehlt. Dieser Befund warf die Frage auf, ob dieses Gen möglicherweise das serologisch nachweisbare, gering polymorphe und in *lm2* fehlende *RT1.R* ist [74]. Die RFLP-Untersuchung von *lm2* belegt, daß durch die genomische Deletion bis zu 3 Klasse I Gene verloren gegangen sind, von denen wahrscheinlich 2 der *11/3R*-Familie angehören. Hiervon trägt eines das $\Delta 44$ -Motiv und eines nicht. Die Addition der Längen aller sicher fehlenden Fragmente führte zu einer Größenabschätzung des in *lm2* deletierten, genomischen Bereiches von etwa 40 kb. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß *lm2* sicher ein bis zwei Klasse I Gene fehlen, von denen zumindest eines klar exprimiert wird [112]. Die vorliegenden Daten ergänzen die bisherigen Ergebnisse dahingehend, daß in *lm2* sehr wahrscheinlich drei Klasse I Gene deletiert sind, und dementsprechend die Ausdehnung des in *lm2* verlorenen Abschnitts der *RT1.C/E*-Region größer ist, als bisher angenommen wurde. Die Frage, ob *RT1.R* ein Mitglied der *11/3R*-Familie ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Der *RT1*-Haplotyp *n* der BN-Ratte ist in der PCR-Analyse mit den NC2/490-Primern neben den Haplotypen *lm1* und *lm2* der einzige, der nicht beide PCR-Produkte aufweist. Dem *n*-Haplotyp fehlt hierbei das gleiche Produkt wie *lm1*, und wie in der Deletionsmutante ist daher auch in diesem Stamm ein Teil der mit den NC2/490-Primern nachweisbaren *11/3R*-ähnlichen Gene nicht vorhanden. Die RFLP-Analyse bestätigt diese Annahme. Der *n*-Haplotyp besitzt nach *EcoRI*-Verdauung nur acht, nach *BamHI/EcoRI*-Doppelverdauung neun mit der NC2/490-Sonde hybridisierende Fragmente. Im Vergleich hierzu wurde in den Haplotypen *l* und *u* in den RFLP-Untersuchungen etwa die doppelte Anzahl an *11/3R*-positiven Fragmenten nachgewiesen. Die stark unterschiedliche Anzahl der *11/3R*-ähnlichen Gene in den unabhängigen Haplotypen *l*, *n* und *u* kennzeichnet die Dynamik der proximalen *RT1.C/E*-Region.

Die im Rahmen dieser Arbeit begonnene molekulargenetische Charakterisierung des neu entdeckten mutanten Stammes LEW.1UM1 liefert hierzu weitere Hinweise. Die Lage des Rekombinationspunktes in LEW.1UM1 kann durch die in dieser Arbeit beschriebenen PFGE-Polymorphismen in den Bereich zwischen den Genorten *Bat1* und *Pou5f1* bestimmt werden. Das Rekombinationsereignis erfolgte somit eindeutig innerhalb der *RT1.C/E*-Region, und diese enthält daher in der neuen Rekombinanten Anteile beider Parentalstämme. Aufgrund

dieser Befunde stellt LEW.1UM1 ein interessantes Gegenstück zu den beschriebenen Deletionsmutanten der *RT1.C/E*-Region dar.

Die Analyse der Klasse I positiven Fragmente des neuen Stammes belegt klar, daß es durch die Rekombination zu einem deutlichen Zugewinn an Klasse I Genen gekommen ist. Die Gewinn-Mutation in LEW.1UM1 führte dazu, daß gegenüber beiden Parentalhaplotypen zusätzlich jeweils etwa 100 kb Klasse I positive Fragmente vorhanden sind. Die Gesamtzahl dieser Fragmente ist damit in LEW.1UM1 gegenüber beiden Parentalstämmen deutlich erhöht und auch nach Hybridisierung mit der NC2/490-Sonde lassen sich in *um1* im Vergleich zu beiden Parentalhaplotypen rund ein Drittel mehr Fragmente nachweisen. Den RFLP-Befunden zufolge liegen in *um1* nahezu alle mit den verwendeten Sonden nachweisbaren Klasse I Gene aus den *RT1.C/E*-Regionen beider Parentalhaplotypen vor. Ein Teil der Fragmente ist jedoch nicht zwischen *RT1^l* und *RT1^u* polymorph und so kann für diese Fragmente in *RT1^{um1}* nicht angegeben werden, aus welchem Parentalhaplotyp sie stammen. Auffällig ist jedoch, daß in keiner der RFLP-Analysen das Fehlen von mehr als zwei *l*-spezifischen Fragmenten nachgewiesen wird und auch nur in einem einzigen Experiment überhaupt eine einzelne *u*-spezifische Bande fehlt. Mit keiner der vier verwendeten Hybridisierungssonden kann ein Hinweis auf das Fehlen einer größeren Zahl von Klasse I Genen, weder aus *RT1^l* noch aus *RT1^u*, gefunden werden.

Hieraus läßt sich die Hypothese formulieren, daß in LEW.1UM1 die *RT1.C/E*-Region des *u*-Haplotyps bis auf das letzte Klasse I-Gen vor *Pou5f1* erhalten geblieben ist und aufgrund des ungleichen Crossing-over zusätzlich auch dieser Bereich aus dem Haplotyp *l* mit Ausnahme der ersten beiden Klasse I-Gene telomer von *Bat1* übertragen wurde. Von dem ersten Klasse I Gen hinter *Bat1* ist bekannt, daß es sich in *RT1^l* um ein Pseudogen handelt [84]. Es ist das in Cosmidcluster III der LEW-Ratte lokalisierte *l*-Allel von *RT1.A-4*, für das in dieser Arbeit bereits bei der Untersuchung der Cosmidklone gezeigt wurde, daß es ein Mitglied der *II/3R*-Familie ist. Das Fehlen dieses Pseudogens in *um1* resultierte nicht in einer Abstoßung von *r14*-Hauttransplantaten, obzwar *r14* das entsprechende Gen trägt. Das telomer von *Bat1* zweite Klasse I Gen ist vermutlich ebenfalls ein Pseudogen. Das aufgrund der vorgestellten Befunde in *um1* fehlende Klasse I Gen des *u*-Haplotyps ist vermutlich das serologisch nachweisbare *RT1.C^u*-Molekül. Das Gen dieses serologisch nachgewiesenen *C^u*-Molekül kartiert somit in die unmittelbare Nähe von *Pou5f1* in die proximale *RT1.C/E*-Region.

Die *I1/3R*-Gene stellen in der Ratte eine umfangreiche Gruppe von Klasse Ib-Genen der *RT1.C/E*-Region dar. Die einzelnen Gene sind nach den vorliegenden Befunden über die proximale *RT1.C/E*-Region verteilt und liegen in gemischter Folge mit anderen Klasse I Genen vor. Ihre Anzahl variiert aufgrund häufiger Genduplikationen und -deletionen innerhalb der *RT1.C/E*-Region erheblich zwischen verschiedenen Haplotypen. Die Gene bilden eine heterogene Gruppe, in der wahrscheinlich neben gering polymorphen auch polymorphe Gene vorliegen.

4.3 Expansion und Kontraktion der *RT1.C/E*-Region

Die in dieser Arbeit untersuchte *RT1.C/E*-Region unterliegt ausgesprochen dynamischen Veränderungen in Bezug auf ihre Ausdehnung und die Anzahl der in ihr liegenden Klasse Ib Gene. Die Variabilität ihrer Ausdehnung wird durch die Analyse der vier mutanten *RT1*-Haplotypen *lm1*, *lm2*, *lm3* und *um1* verdeutlicht. Während die drei *l*-mutanten Haplotypen umfangreiche Deletionen in der *RT1.C/E*-Region aufweisen und dabei dem *lm1*-Haplotyp etwa 500 kb dieses Abschnitts fehlen, ist in der *u/l*-rekombinanten Mutante *um1* nach den vorliegenden Befunden wahrscheinlich nahezu der gesamte Anfangsbereich zwischen den Markern *Bat1* und *Pou5f1* verdoppelt. Allein die in diesem Haplotyp gegenüber beiden Parentalhaplotypen zusätzlich vorhandenen Klasse I positiven Fragmente ergeben addiert bereits einen Längenzuwachs von etwa 100 kb.

Diese Mutationen sind im Zuge von Kreuzungsexperimenten auf natürliche Weise durch ungleiches Crossing-over entstanden und nicht etwa durch eine Bestrahlung oder durch die Behandlung mit mutagenen Substanzen. Der Anfangsbereich dieser telomeren Klasse I Region im MHC der Ratte ist demnach ein Ort häufiger mit Gen-Duplikationen und -Deletionen verbundener Rekombination. Dies wird auch belegt durch die Untersuchungen zur Charakterisierung der *I1/3R*-Familie. Die Anzahl der *I1/3R*-ähnlichen Gene ist nicht nur zwischen den genannten Mutanten sehr unterschiedlich, sie variiert auch bei einer Reihe von unabhängigen *RT1*-Haplotypen stark. Im *n*-Haplotyp der BN-Ratte werden nur etwa halb so viele *I1/3R*-Gene wie in den Haplotypen *l* oder *u* nachgewiesen.

Neben diesen großräumigen Deletionen und Duplikationen ist der Nachweis von komigrierenden, Klasse I positiven Fragmenten mit untereinander übereinstimmender Hybridisierungscharakteristik ein deutlicher Hinweis auf Duplikationen entweder einzelner

Klasse I Gene oder zusammenhängender kleinerer Gengruppen innerhalb der *RTI.C/E*-Region des *I*-Haplotyps. Ähnliches wurde auch in dem *RTI*-Haplotyp *av1* nachgewiesen [60]. Bei der Restriktionsanalyse von 115 Cosmidklonen aus dessen *RTI.C/E*-Region traten mehrere wiederkehrende Fragmentmuster auf, die auf entsprechende Duplikationen von Klasse I Genen zurückgeführt wurden. Dabei wurde festgestellt, daß die Duplikationseinheit im *av1*-Haplotyp jeweils drei Klasse I Genen umfaßt. Dies stellt einen Gegensatz zu den beschriebenen Tandemduplikationen der Klasse Ib Gene in der *H-2Q*- und der *H-2T*-Region der Maus dar [45, 50, 51]. Sequenzvergleiche der *Q*-Gene zeigen, daß die *H-2Q*-Region wahrscheinlich durch die Verdopplung eines Ursprungsgenes mit nachfolgender Duplikation des resultierenden Genpaares entstanden ist.

Eine aus zwei Klasse I Genen bestehende Duplikationseinheit wird in der Ratte für die Gene *RTI.N* und *RTI.O* gefunden [67]. Während *RTI.O* als *H-2Q*-ähnlich beschrieben wird, besitzt *RTI.N* mehr Homologie zu den Genen der murinen *H-2T*-Region als zu anderen Klasse I Genen der Ratte [66, 70]. Im *H-2*-Komplex der Maus ist die *T*-Region die Region mit den größten Variabilitäten [143]. In der Ratte nehmen sich hingegen die zwischen verschiedenen *RTI*-Haplotypen festgestellten Unterschiede im distalen Teil der *RTI.C/E*-Region gegenüber denen im proximalen zwischen *Bat1* und *Pou5f1* gelegenen Teil verhältnismäßig gering aus. Im *RTI*-Komplex der Ratte scheint daher die proximale *RTI.C/E*-Region der Bereich größter Variabilität zu sein.

Trotz dieser Unterschiede zwischen den MHC-Regionen der Maus und der Ratte existieren bedeutende Gemeinsamkeiten. Die Kartierung einer Reihe von Nicht-Klasse I Markern der *RTI.C/E*-Region zeigte, daß sie in der gleichen Reihenfolge und häufig auch in einem vergleichbaren Abstand zueinander vorliegen, wie in der Maus oder im Menschen ([84] und eigene Daten). Das Nebeneinander von streng konservierten Genpositionen einerseits und ausgesprochen dynamischen Klasse Ib-Bereichen andererseits wird durch die „Framework“-Hypothese anschaulich erklärt [83]. Danach ist der Verlust oder die Mutation bestimmter konservierter Gene im MHC unmittelbar letal für den betroffenen Organismus. Diese Gene bleiben daher unverändert in Struktur und Position. Sie bilden dadurch einen Bezugsrahmen für den spezieübergreifenden Vergleich der komplexen MHC-Regionen. Zwischen den Markern liegen „permissive“ Zonen, in denen Veränderungen wie Deletionen, Duplikationen, Translokationen oder Geninversionen keine oder keine unmittelbar schädigende Wirkung haben und daher zugelassen sind. In diesen Zonen liegen die Klasse Ib Gene. Das Resultat ist,

wie auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen, ein ausgesprochen dynamischer Multigenkomplex, der trotz aller Besonderheiten der einzelnen Spezies einen direkten Vergleich anhand der Bezugsmarkergene erlaubt.

Ein Beispiel für einen solchen konservierten Marker in der *RTI.C/E*-Region ist das Gen des Transkriptionsfaktors *Pou5f1* [101], in dessen unmittelbarer Nähe sowohl der Rekombinationspunkt in LEW.1UM1, als auch die umfangreiche Deletion in LEW.1LM1 lokalisiert ist. Seine relative Position zu den benachbarten Markergenen *Bat1* auf der zentromeren Seite und *Tcf19* auf der telomeren Seite blieb sowohl von der Kontraktion der Region um etwa 500 kb in *Im1*, als auch von der vermutlich wenigstens ebenso großen Expansion in *um1* unberührt. Der Abstand von *Pou5f1* zu *Bat1* variiert jedoch aufgrund der dynamischen Veränderungen in den beiden mutanten Haplotypen beträchtlich.

Diese Plastizität der *RTI.C/E*-Region ist keine Besonderheit des MHC der Ratte. Jede Multigenfamilie mit eng benachbarten und untereinander ähnlichen Genen tendiert durch ungleiches Crossing-over zu Expansionen und Kontraktionen. Auch für die *H-2D*- und *H-2Q*-Region der Maus sind ähnliche Ereignisse beschrieben [40, 44, 46, 144].

Die Tiere der in dieser Arbeit untersuchten mutanten Haplotypen sind durch die umfangreichen Veränderungen innerhalb der Klasse Ib Multigenfamilie, wie sie die vorgelegten Ergebnisse beschreiben, in ihrer Lebensfähigkeit und Fruchtbarkeit nicht beeinträchtigt und sind phänotypisch unauffällig. Trotzdem müssen die von den Umordnungen betroffenen Gene nicht ohne funktionelle Bedeutung sein. Zum einen sind verschiedene Gene vermutlich nur in bestimmten Situationen wichtig, wie sie unter Laboratoriumsbedingungen nicht auftreten. Zum anderen besteht aufgrund der zahlreichen Genduplikationen innerhalb der Klasse Ib Familie die Möglichkeit, daß der Verlust einzelner funktioneller Gene durch andere, verwandte Gene ähnlicher Funktion kompensiert wird.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der telomeren Klasse I Region des MHC der Ratte, der *RT1.C/E*-Region. Für deren Klasse Ib Genprodukte liegen zahlreiche Hinweise auf Funktionen bei der T-Zellrestriktion und der Regulation alloreaktiver NK-Zellen vor. Die Zuordnung erkannter Funktionen zu einzelnen Genen wird durch die noch unvollständige Kenntnis der Struktur dieser Region erschwert. Ziel der Untersuchungen war daher die Aufklärung des strukturellen Aufbaus der *RT1.C/E*-Region.

Die im ersten Teil der Arbeit beschriebenen, mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführten Analysen kartieren die Deletion des mutanten Haplotyps *RT1^{lm1}* in die Nähe des Markergens *Pou5f1* im proximalen Bereich von *RT1.C/E*. Die Größe dieser Deletion ergibt sich aus der PFGE-Analyse Klasse I positiver MluI-Restriktionsfragmente zu etwa 500 kb. Die Deletion des mutanten Haplotyps *RT1^{lm3}* wird in den gleichen Bereich wie die *lm1*-Deletion kartiert und besitzt eine Größe von etwa 80 kb.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer Genfamilie der *RT1.C/E*-Region, die durch Sonden aus dem exprimierten Klasse I Gen *I1/3R* definiert ist. Gene dieser Familie werden durch PCR- und RFLP-Analysen in allen untersuchten *RT1*-Haplotypen nachgewiesen, wobei ihre Anzahl zwischen 7 Genen in *RT1^{lv1}* und 18 in *RT1^u* variiert. Anhand eines 44 bp Motivs in der 3' untranslatierten Region dieser Gene werden zwei Subsets der Familie unterschieden. Diese sind in gemischter Folge verteilt in der proximalen *RT1.C/E*-Region lokalisiert.

Der dritte Teil beschreibt die molekulargenetische Charakterisierung des mutanten Haplotyps *RT1^{um1}*. PFGE-Untersuchungen kartieren seinen Rekombinationspunkt zwischen die Marker *Bat1* und *Pou5f1* in die proximale *RT1.C/E*-Region. RFLP-Analysen mit verschiedenen Klasse I Sonden zeigen, daß in *um1* aufgrund eines ungleichen Crossing-over nahezu der gesamte Bereich zwischen *Bat1* und *Pou5f1* verdoppelt ist.

Die Charakterisierung der mutanten Haplotypen zeigt die besondere Dynamik der telomeren Klasse Ib Region auf und erleichtert das Verständnis ihrer funktionellen Besonderheiten. Die PFGE-Kartierung einer Reihe von Markergenen des MHC der Ratte und die dabei gefundenen Polymorphismen erweitern das zur Verfügung stehende Instrumentarium für weiterführende Analysen dieser Multigenfamilie und ermöglichen zudem einen spezieübergreifenden Vergleich mit den MHC Regionen von Mensch und Maus.

6 Literatur

1. Tysoe-Calnon, V.A., J.E. Grundy, and S.J. Perkins, *Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences*. Biochem J, 1991. **277**(Pt 2): p. 359-69.
2. Bjorkman, P.J., et al., *The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 512-8.
3. Bjorkman, P.J., et al., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
4. Garrett, T.P., et al., *Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68 [see comments]*. Nature, 1989. **342**(6250): p. 692-6.
5. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
6. Stevens, J., et al., *Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries*. Eur J Immunol, 1998. **28**(4): p. 1272-9.
7. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
8. Yeager, M., M. Carrington, and A.L. Hughes, *Class I and class II MHC bind self peptide sets that are strikingly different in their evolutionary characteristics*. Immunogenetics, 2000. **51**(1): p. 8-15.
9. Grandea, A.G., 3rd, et al., *Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP*. Science, 1995. **270**(5233): p. 105-8.
10. Day, P.M., et al., *Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8064-9.
11. Chiu, I., D.M. Davis, and J.L. Strominger, *Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13944-9.
12. Klein, J. and O.h. C, *The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes [comment]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6251-2.
13. Bahram, S., et al., *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes [see comments]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6259-63.
14. Braud, V., E.Y. Jones, and A. McMichael, *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, 1997. **27**(5): p. 1164-9.
15. Lee, N., et al., *HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4951-60.
16. Braud, V.M., et al., *TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide*. Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 1-10.
17. Borrego, F., et al., *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis*. J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 813-8.
18. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C [see comments]*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
19. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A [see comments]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5199-204.
20. Long, E.O., *Signal sequences stop killer cells [news; comment]*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 740-1, 743.
21. Connolly, D.J., et al., *A cDNA clone encoding the mouse Qa-1a histocompatibility antigen and proposed structure of the putative peptide binding site*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6089-98.
22. Parker, K.E., et al., *The rat RT.BM1 MHC class I cDNA shows a high level of sequence similarity to the mouse H-2T23d gene*. Immunogenetics, 1991. **34**(3): p. 211-3.

23. Aldrich, C.J., *et al.*, Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen. *Cell*, 1994. **79**(4): p. 649-58.
24. Chumbley, G., *et al.*, Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol*, 1994. **155**(2): p. 312-22.
25. Mandelboim, O., *et al.*, Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(26): p. 14666-70.
26. Munz, C., *et al.*, Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med*, 1997. **185**(3): p. 385-91.
27. Pende, D., *et al.*, HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(8): p. 1875-80.
28. Ober, C., HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet*, 1998. **62**(1): p. 1-5.
29. Pamer, E.G., *et al.*, H-2M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell*, 1992. **70**(2): p. 215-23.
30. Kurlander, R.J., *et al.*, Specialized role for a murine class I-b MHC molecule in prokaryotic host defenses. *Science*, 1992. **257**(5070): p. 678-9.
31. Scofield, V.L., *et al.*, Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. *Nature*, 1982. **295**(5849): p. 499-502.
32. Kaufman, J., Co-evolving genes in MHC haplotypes: the "rule" for nonmammalian vertebrates? *Immunogenetics*, 1999. **50**(3-4): p. 228-36.
33. Delarbre, C., *et al.*, Evolution of the major histocompatibility complex: a hundred-fold amplification of MHC class I genes in the African pigmy mouse *Nannomys setulosus*. *Immunogenetics*, 1992. **37**(1): p. 29-38.
34. Spies, T., *et al.*, A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway [see comments]. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 744-7.
35. Trowsdale, J., *et al.*, Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters [see comments]. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 741-4.
36. Monaco, J.J., S. Cho, and M. Attaya, Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1723-6.
37. Deverson, E.V., *et al.*, MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters [see comments]. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 738-41.
38. Rolstad, B., *et al.*, Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells. *Immunol Rev*, 1997. **155**: p. 91-104.
39. Joly, E., *et al.*, The rat MHC haplotype RT1c expresses two classical class I molecules. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1551-8.
40. Weiss, E.H., *et al.*, Organization and evolution of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse. *Nature*, 1984. **310**(5979): p. 650-5.
41. Watts, S., *et al.*, Organization and structure of the Qa genes of the major histocompatibility complex of the C3H mouse: implications for Qa function and class I evolution. *Embo J*, 1989. **8**(6): p. 1749-59.
42. Steinmetz, M., *et al.*, Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell*, 1982. **28**(3): p. 489-98.
43. Litaker, W., A. Peace-Brewer, and J.A. Frelinger, A physical map of the Q region of B10.P. *Mamm Genome*, 1996. **7**(3): p. 200-5.
44. Devlin, J.J., *et al.*, Duplicated gene pairs and alleles of class I genes in the Qa2 region of the murine major histocompatibility complex: a comparison. *Embo J*, 1985. **4**(12): p. 3203-7.
45. Mellor, A.L., J. Antoniou, and P.J. Robinson, Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(17): p. 5920-4.

46. O'Neill, A.E., *et al.*, *Extensive deletions in the Q region of the mouse major histocompatibility complex*. Immunogenetics, 1986. **24**(6): p. 368-73.
47. Forman, J., *et al.*, *The Qa2 subregion controls the expression of two antigens recognized by H-2-unrestricted cytotoxic T cells*. J Exp Med, 1982. **155**(3): p. 749-67.
48. Rotzschke, O., *et al.*, *Qa-2 molecules are peptide receptors of higher stringency than ordinary class I molecules*. Nature, 1993. **361**(6413): p. 642-4.
49. Lowen, L.C., C.J. Aldrich, and J. Forman, *Analysis of T cell receptors specific for recognition of class IB antigens*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6155-65.
50. Fisher, D.A., S.W.d. Hunt, and L. Hood, *Structure of a gene encoding a murine thymus leukemia antigen, and organization of Tla genes in the BALB/c mouse*. J Exp Med, 1985. **162**(2): p. 528-45.
51. Hammerling, U., *et al.*, *Gene duplications in the TL region of the mouse major histocompatibility complex*. Embo J, 1985. **4**(6): p. 1431-4.
52. Vidovic, D., *et al.*, *Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a gamma delta T-cell hybridoma*. Nature, 1989. **340**(6235): p. 646-50.
53. Ito, K., *et al.*, *Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor*. Cell, 1990. **62**(3): p. 549-61.
54. Sipes, S.L., *et al.*, *A new major histocompatibility complex class I b gene expressed in the mouse blastocyst and placenta*. Immunogenetics, 1996. **45**(2): p. 108-20.
55. Jones, E.P., *et al.*, *MHC class I gene organization in > 1.5-Mb YAC contigs from the H2-M region*. Genomics, 1995. **27**(1): p. 40-51.
56. Jones, E.P., *et al.*, *Mhc class I and non-class I gene organization in the proximal H2-M region of the mouse*. Immunogenetics, 1999. **49**(3): p. 183-95.
57. Princiotta, M.F., *et al.*, *H2-M3 restricted presentation of a Listeria-derived leader peptide*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1711-9.
58. Shawar, S.M., *et al.*, *Specialized functions of major histocompatibility complex class I molecules. II. Hmt binds N-formylated peptides of mitochondrial and prokaryotic origin*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 941-4.
59. Byers, D.E. and K. Fischer Lindahl, *H2-M3 presents a nonformylated viral epitope to CTLs generated in vitro*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 90-6.
60. Jameson, S.C., *et al.*, *Cloning and expression of class I major histocompatibility complex genes of the rat*. J Exp Med, 1992. **175**(6): p. 1749-57.
61. Lambracht, D., *et al.*, *Mapping of H2-M homolog and MOG genes in the rat MHC*. Immunogenetics, 1995. **42**(5): p. 418-21.
62. Wang, C.R., *et al.*, *Rat RT1 orthologs of mouse H2-M class Ib genes*. Immunogenetics, 1995. **42**(1): p. 63-7.
63. Lambracht-Washington, D., *et al.*, *A polymorphic microsatellite marker in the rat major histocompatibility complex class I gene, RT1.M4, and a new recombinant RT1 haplotype, r39*. Immunogenetics, 1998. **48**(6): p. 420-1.
64. Amadou, C., *et al.*, *The mouse major histocompatibility complex: some assembly required*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 211-21.
65. Kirisits, M.J., *et al.*, *Multiple TL-like loci in the grc-G/C region of the rat*. Immunogenetics, 1994. **39**(5): p. 301-15.
66. Rushton, J.J., *et al.*, *Genomic structure and organization of a Q-like gene in the GRC-G/C region of the rat*. Eur J Immunogenet, 1994. **21**(3): p. 189-98.
67. Yuan, X.J., *et al.*, *Physical mapping of the E/C and grc regions of the rat major histocompatibility complex [see comments]*. Immunogenetics, 1996. **44**(1): p. 9-18.
68. Salgar, S.K., *et al.*, *Physical mapping and structural analysis of new gene families RT1.S and Rps2r in the grc region of the rat major histocompatibility complex*. Immunogenetics, 1997. **45**(6): p. 353-64.

69. Salgar, S.K., H.W. Kunz, and T.J. Gill, 3rd, *Structural organization, sequence analysis, and physical mapping of the Grc-linked class Ib gene RT1.S3 in the rat*. Immunogenetics, 1998. **48**(1): p. 76-81.
70. Kirisits, M.J., et al., *Genomic DNA sequence and organization of a TL-like gene in the grc-G/C region of the rat*. Immunogenetics, 1992. **35**(6): p. 365-77.
71. Kunz, H.W., et al., *Growth and reproduction complex in the rat. Genes linked to the major histocompatibility complex that affect development*. J Exp Med, 1980. **152**(6): p. 1506-18.
72. Vardimon, D., et al., *Physical mapping of the MHC and grc by pulse field electrophoresis*. Immunogenetics, 1992. **35**(3): p. 166-75.
73. Melhem, M.F., H.W. Kunz, and T.J.d. Gill, *A major histocompatibility complex-linked locus in the rat critically influences resistance to diethylnitrosamine carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1967-71.
74. Wonigeit, K. and L. Hanisch, *Two new class I loci in the rat major histocompatibility complex: RT1.L and RT1.M*. Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 468-70.
75. Wurst, W., K. Wonigeit, and E. Gunther, *A mutant rat major histocompatibility haplotype showing a large deletion of class I sequences*. Immunogenetics, 1989. **30**(4): p. 237-42.
76. Lambracht, D., et al., *Restriction fragment-length polymorphism analysis of a second laboratory-derived mutant RT1 haplotype*. Transplant Proc, 1990. **22**(6): p. 2512-3.
77. Gill, T.J., 3rd, et al., *Current status of the major histocompatibility complex in the rat*. Transplant Proc, 1995. **27**(2): p. 1495-500.
78. Rothermel, E., et al., *Characterization of a class Ib gene of the rat major histocompatibility complex*. Immunogenetics, 1993. **38**(2): p. 82-91.
79. Walter, L., L. Heine, and E. Gunther, *Sequence, expression, and mapping of a rat Mhc class Ib gene*. Immunogenetics, 1994. **39**(5): p. 351-4.
80. Schulze, F., et al., *Expression of RT1.C antigens on lymphoid cells: analysis by monoclonal antibodies*. Transplant Proc, 1990. **22**(6): p. 2514-6.
81. Lambracht, D. and K. Wonigeit, *Sequence analysis of the promoter regions of the classical class I gene RT1.A1 and two other class I genes of the rat MHC*. Immunogenetics, 1995. **41**(6): p. 375-9.
82. Leong, L.Y., et al., *RT1-U: identification of a novel, active, class Ib alloantigen of the rat MHC*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 743-52.
83. Amadou, C., *Evolution of the Mhc class I region: the framework hypothesis*. Immunogenetics, 1999. **49**(4): p. 362-7.
84. Lambracht, D., et al., *Markers for interspecies relationship in the RT1 complex*. Transplant Proc, 1997. **29**(3): p. 1665-7.
85. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition [see comments]*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
86. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
87. Boles, K.S., et al., *Cloning of a new lectin-like receptor expressed on human NK cells*. Immunogenetics, 1999. **50**(1-2): p. 1-7.
88. Reyburn, H., et al., *Human NK cells: their ligands, receptors and functions*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 119-25.
89. Colonna, M., *Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 127-33.
90. Moretta, A., et al., *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells*. J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 875-84.
91. Vaage, J.T., et al., *Control of rat natural killer cell-mediated allorecognition by a major histocompatibility complex region encoding nonclassical class I antigens*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 641-51.
92. Naper, C., et al., *Alloreactive natural killer cells in the rat: complex genetics of major histocompatibility complex control*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1249-56.

93. Kraus, E., *et al.*, *Negative regulation of rat natural killer cell activity by major histocompatibility complex class I recognition*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2582-6.
94. Bolivar, F. and K. Backman, *Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors*. Methods Enzymol, 1979. **68**: p. 245-67.
95. Cami, B. and P. Kourilsky, *Screening of cloned recombinant DNA in bacteria by in situ colony hybridization*. Nucleic Acids Res, 1978. **5**(7): p. 2381-90.
96. Ehrlich, E., *et al.*, *A family of cosmid vectors with the multi-copy R6K replication origin*. Gene, 1987. **57**(2-3): p. 229-37.
97. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p. 103-19.
98. Wurst, W., E. Roethermel, and E. Gunther, *Genetic mapping of C4 and Bf complement genes in the rat major histocompatibility complex*. Immunogenetics, 1988. **28**(1): p. 57-60.
99. Wroblewski, J.M., S.G. Kaminsky, and I. Nakamura, *Bat-1 genes and the origin of multiple class I loci in the H-2D region*. Immunogenetics, 1994. **39**(4): p. 276-80.
100. Nedospasov, S.A., *et al.*, *The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF- beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(19): p. 7713-25.
101. Uehara, H., *Mouse Oct-3 maps between the tcl12 embryonic lethal gene and the Qa gene in the H-2 complex*. Immunogenetics, 1991. **34**(4): p. 266-9.
102. Yoshino, M., *et al.*, *Genomic evolution of the distal Mhc class I region on mouse Chr 17*. Hereditas, 1997. **127**(1-2): p. 141-8.
103. Zhou, Y. and D.D. Chaplin, *Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9470-4.
104. Denizot, F., *et al.*, *YAC-assisted cloning of a putative G-protein mapping to the MHC class I region [published erratum appears in Genomics 1993 Sep;17(3):800]*. Genomics, 1992. **14**(4): p. 857-62.
105. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
106. Rigby, P.W., *et al.*, *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I*. J Mol Biol, 1977. **113**(1): p. 237-51.
107. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal Biochem, 1983. **132**(1): p. 6-13.
108. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *"A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity"*. Addendum. Anal Biochem, 1984. **137**(1): p. 266-7.
109. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
110. Cohen, S.N., A.C. Chang, and L. Hsu, *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(8): p. 2110-4.
111. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
112. Lambracht, D., *Molekulargenetische Charakterisierung von atypischen Klasse I Antigenen des MHC der Ratte (RT1 System)*, in *Fachbereich Biologie*. 1994, Universität Hannover: Hannover.
113. Lambracht, D., H.J. Hedrich, and K. Wonigeit, *Deletion of major histocompatibility complex class I genes in a new mutant RT1 haplotype (Im3) defined in BN.1LM3/Han rats*. Transplant Proc, 1993. **25**(5): p. 2756-8.
114. Wurst, W., *et al.*, *Localization of heat shock protein 70 genes inside the rat major histocompatibility complex close to class III genes*. Immunogenetics, 1989. **30**(1): p. 46-9.

115. Forbes, S.A. and J. Trowsdale, *The MHC quarterly report*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 152-9.
116. Lund, T., C. Carter, and R.D. Campbell, *Pulsed field gel electrophoretic analysis of the rat major histocompatibility complex class III region shows extensive inter- species conservation*. Mamm Genome, 1994. **5**(5): p. 282-7.
117. Walter, L. and E. Gunther, *Clonal contigs of the class I regions of the rat major histocompatibility complex*. Transplant Proc, 1997. **29**(3): p. 1660.
118. Spies, T., *et al.*, *A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex*. Science, 1989. **243**(4888): p. 214-7.
119. Nalabolu, S.R., *et al.*, *Genes in a 220-kb region spanning the TNF cluster in human MHC*. Genomics, 1996. **31**(2): p. 215-22.
120. Yeom, Y.I., *et al.*, *Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene*. Mech Dev, 1991. **35**(3): p. 171-9.
121. Crouau-Roy, B., *et al.*, *Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping*. Genomics, 1994. **21**(1): p. 241-3.
122. Krishnan, B.R., I. Jamry, and D.D. Chaplin, *Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes*. Genomics, 1995. **30**(1): p. 53-8.
123. Nelson, M., E. Raschke, and M. McClelland, *Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(13): p. 3139-54.
124. Roberts, R.J. and D. Macelis, *REBASE--restriction enzymes and methylases*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(13): p. 3125-37.
125. Krieg, A.M., *The role of CpG motifs in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 35-43.
126. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg, *CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9305-10.
127. Bird, A., *The essentials of DNA methylation*. Cell, 1992. **70**(1): p. 5-8.
128. Hendrich, B., *Methylation moves into medicine*. Curr Biol, 2000. **10**(2): p. R60-3.
129. Boucraut, J., *et al.*, *Differential nuclear expression of enhancer A DNA-binding proteins in human first trimester trophoblast cells*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3882-94.
130. Guillaudeux, T., *et al.*, *Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3283-99.
131. Del Pozzo, G. and J. Guardiola, *The regulation mechanism of HLA class II gene expression at the level of mRNA stability*. Immunogenetics, 1996. **44**(6): p. 453-8.
132. Antequera, F., J. Boyes, and A. Bird, *High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines*. Cell, 1990. **62**(3): p. 503-14.
133. Weiss, E.H., *et al.*, *The structure of a mutant H-2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events*. Nature, 1983. **301**(5902): p. 671-4.
134. Jaulin, C., *et al.*, *Polymorphism in mouse and human class I H-2 and HLA genes is not the result of random independent point mutations*. Immunogenetics, 1985. **22**(5): p. 453-70.
135. Hogstrand, K. and J. Bohme, *Gene conversion of major histocompatibility complex genes is associated with CpG-rich regions*. Immunogenetics, 1999. **49**(5): p. 446-55.
136. Waalwijk, C. and R.A. Flavell, *MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites*. Nucleic Acids Res, 1978. **5**(9): p. 3231-6.
137. Uitterlinden, A.G., *et al.*, *Variation in restriction fragment length and methylation pattern of rat MHC class I genes*. Exp Clin Immunogenet, 1985. **2**(4): p. 215-22.
138. Lambrecht, D., F. Schulze, and K. Wonigeit, *Cloning of the RT1.L gene coding for a low polymorphic class I antigen in the rat*. Transplant Proc, 1993. **25**(5): p. 2766-7.
139. Mauxion, F., J. Sobczak, and M. Kress, *Characterization of five distinct cDNA clones encoding for class I RT1 antigens*. Immunogenetics, 1989. **29**(6): p. 397-401.

140. Elliott, E., *et al.*, *Genetics and expression of the Q6 and Q8 genes. An LTR-like sequence in the 3' untranslated region.* Immunogenetics, 1989. **29**(6): p. 371-9.
141. Nakayama, K., *et al.*, *Comparative structure of two duplicated T1a class I genes (T10c and 37) of the murine H-2d MHC. Implications on the evolution of the T1a region.* J Immunol, 1990. **144**(6): p. 2400-8.
142. Walter, L., *et al.*, *Genomic organization and sequence of the rat major histocompatibility complex class Ia gene RT1.Au.* Immunogenetics, 1995. **41**(5): p. 332.
143. Fischer Lindahl, K., *On naming H2 haplotypes: functional significance of MHC class Ib alleles.* Immunogenetics, 1997. **46**(1): p. 53-62.
144. Rubocki, R.J., *et al.*, *Molecular evidence that the H-2D and H-2L genes arose by duplication. Differences between the evolution of the class I genes in mice and humans.* J Exp Med, 1990. **171**(6): p. 2043-61.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Björn Bortfeldt
Geburtsdatum	11. Februar 1965
Geburtsort	Erlangen
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder (4 und 1)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

Grundschule	1970 bis 1974 in Rotenburg/Wümme
Gymnasium	1974 bis 1984 Ratsgymnasium Rotenburg/Wümme
	Abitur am 30.06.1984

Wehrdienst

Juli 1984 bis Juni 1988	Sprachenausbildung Russisch bis Leistungsstufe II Einsatz als FmAufklUffz in der FmKp 945 in Ehra-Lessien
-------------------------	--

Studium

Oktober 1988 bis Juni 1995	Studium der Biochemie mit dem Ziel Diplom am Fachbereich Chemie der Universität Hannover
November 1994	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Technische Chemie
Dezember 1994 bis Juni 1995	Diplomarbeit zum Thema „Erstellung einer cDNA-Bank für die Isolierung eines ELIP-Klons bei <i>Arabidopsis thaliana</i> “ am Institut für Botanik der Universität Hannover
Juli 1995 bis Februar 1996	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. Dr. F. Herzfeld am Institut für Botanik der Universität Hannover
März 1996 bis Mai 2000	Dissertation zum Thema „Molekulargenetische Charakterisierung der <i>RT1.C/E</i> -Region im MHC der Ratte“ im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Med. Hochschule Hannover
30. Juni 2000	Promotionsprüfung in den Fächern Biochemie und Immunologie
Lehrte, den 5.6.2000	