

**Untersuchung zur Charakterisierung von MIC-Genen im
Haupthistokompatibilitätskomplex des Rhesusaffen
(*Macaca mulatta*)**

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Perris-Fabian Flügge

Geboren am 15.06.1971, in Hildesheim

2003

Referentin: Prof. Dr. Elke Zimmermann
Korreferent: Prof. Dr. Eberhard Günther

Tag der Promotion: 08.07.2003

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Günther in der Abteilung Immungenetik der Universität Göttingen durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit von Frau Prof. Dr. E. Zimmermann aus dem Institut für Zoologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Inhaltsverzeichnis.....	I
I. Zusammenfassung	V
II. Abstract.....	VI
III. Verzeichnis der Abkürzungen	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....	1
1.2 MIC-Gene des Menschen.....	2
1.2.1 Allgemeines	2
1.2.2 Funktion	4
1.3 MIC-Gene des Rhesusaffen	6
1.4 Ziele der Arbeit	8
2. Material	9
2.1 Versuchstiere	9
2.1.1 Rhesusaffen.....	9
2.1.2 Mäuse	11
2.2 Verwendete Zelllinien	11
2.2.1 Eukaryotische Zellen.....	11
2.2.2 Prokaryotische Zellen	12
2.3 Verwendete Materialien.....	12
2.3.1 Verwendete Chemikalien	12
2.3.2 Radiochemikalien.....	14
2.3.3 Enzyme	14
2.3.4 Antikörper	15
2.3.5 Verwendete Kits.....	15
2.3.6 Oligodesoxyribonukleotide	15
2.3.7 Längenstandards	16
2.3.8 Verwendete Vektoren	16
2.3.9 Hybridisierungssonden	17
2.3.10 Lösungen und Puffer.....	17
2.4 Zusammensetzung der Nährmedien	20
2.4.1 Nährmedien für prokaryotische Zellen	20
2.4.2 Zusätze zu Nährmedien für prokaryotische Zellen.....	20
2.4.3 Nährmedien für eukaryotische Zellen	21
2.4.4 Zusätze zu Nährmedien für eukaryotische Zellen.....	21

2.5 Einwegartikel	21
2.6 Geräte	22
2.7 Herstelleradressen	24
3. Methoden	27
3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	27
3.1.1 Präparation von genomischer DNA aus kleinen Gewebemengen	27
3.1.2 Präparation von RNA (CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987).....	27
3.1.3 Kleinansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	28
3.1.4 Großansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präp)	28
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	30
3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen...30	
3.3.1 Auftrennung von DNA.....	31
3.3.2 Auftrennung von RNA.....	31
3.4 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose.....	32
3.4.1 Transfer von DNA – Southernblot (SOUTHERN, 1975).....	32
3.4.2 Transfer von RNA – Northernblot (ALWINE et al., 1977).....	33
3.5 Radioaktive Markierung von DNA durch Random-prime-Reaktion (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983).....	33
3.6 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren	34
3.7 Autoradiographie	35
3.8 Reverse Transkription (RT)	35
3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.9.1 PCR-Protokolle	37
3.10 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit JETSORB..	37
3.11 Klonierung von PCR-Produkten	38
3.12 Nichtradioaktive Sequenzierung von doppelsträngiger DNA (SANGER et al., 1977)	39
3.13 Zellkulturmethoden	41
3.13.1 Allgemeines Arbeiten	41
3.13.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
3.13.3 Gewinnung von Lymphozyten aus peripherem Blut.....	42
3.13.4 Herstellung von Concanavalin A-Überstand (ConA-Überstand)	43

3.13.5 Aktivierung von Killerzellen mit ConA-Überstand (LAK-Zellen).....	43
3.13.6 Kultivierung von Sertoli-Zellen	44
3.13.7 Transfektion eukaryotischer Zellen	44
3.13.8 Selektion transfizierter Zellen.....	44
3.13.9 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	45
3.14 Durchflußzytometrie	45
3.15 Chromfreisetzungstest.....	46
3.16 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	48
3.17 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS- Polyacrylamidgel-Elektrophorese (LAEMMLI, 1970)	48
3.18 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose – Westernblot (TOWBIN et al., 1979).....	49
3.19 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper	50
3.20 Erzeugung von MIC-transgenen Mäusen durch Pronukleusinjektion	50
3.21 Herstellung von Antiseren gegen das MIC3-Molekül.....	51
3.22 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das MIC3-Molekül.....	52
3.23 Immunhistologie	54
3.23.1 Entparaffinierung von Paraffinschnitten	54
3.23.2 Immunfärbung der Paraffinschnitte	54
3.24 Auswertung	55
3.24.1 Verwendete Computerprogramme.....	55
4. Ergebnisse.....	56
4.1 Untersuchung der MIC-Gene im Rhesusaffen.....	56
4.1.1 Untersuchung zur Anwesenheit der drei MIC-Gene beim Rhesusaffen.....	56
4.1.2 Die EBV-transfizierte B-Zell-Linie 1641.....	60
4.1.3 Untersuchung der MIC-Expression im Rhesusaffen mittels Northernblot und RT-PCR.....	62
4.1.4 Immunhistologische Untersuchung der MIC-Expression an Paraffinschnitten von Rhesusaffen	64
4.2 Analyse MIC-exprimierender Transfektanten-Klone der Maus.....	67
4.2.1 Etablierung von Zellklonen nach Transfektion mit einem MIC3- Cosmid.....	67
4.2.2 Funktionelle Untersuchung der MIC-Expression.....	68

4.3 Untersuchungen an MIC2- und MIC3-transgenen Mäusen	71
4.3.1 Etablierung der transgenen Mauslinien.....	71
4.3.2 Untersuchung der MIC-Expression in den transgenen Mäusen.....	71
4.3.3 Untersuchung der MIC-Expression im Testis der MIC-transgenen Mäuse	77
4.3.4 Anti-MIC3-Antiseren.....	78
4.3.5 Versuch der Etablierung eines monoklonalen Anti-MIC-Antikörpers.	80
4.4 Analyse der MIC-Expression nach Hitzeschock	80
4.5 Auftreten von Anti-MIC-Antikörpern im Serum von FVB-Wildtypmäusen nach Verpaarung mit MIC-transgenen Männchen	87
5. Diskussion.....	89
6. Literaturverzeichnis	98
Lebenslauf	105

I. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Expression von MIC-Genen des Rhesusaffen.

Mittels PCR fand sich ein An-/Abwesenheits-Polymorphismus der drei im Genom der Rhesusaffen bekannten MIC-Gene MIC1, MIC2 und MIC3, wobei 33% der untersuchten Rhesusaffen alle drei Gene, 27% zwei und 40% sogar nur ein MIC-Gen besaßen. In einer EBV-B-Zelllinie des Rhesusaffen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass alle drei MIC-Gene gleichzeitig exprimiert sein können, was für Rhesusaffen-Gewebe bestätigt wurde. Darüber hinaus konnte eine MIC-Expression erstmalig auch in B-Zellen nachgewiesen werden. Im Rhesusaffen zeigte sich im Northernblot eine MIC3-Expression in Testis, Milz, Dünndarm, Magen und Dickdarm, sowie mittels RT-PCR in allen getesteten Organen. Eine MIC-Expression auf Proteinebene fand sich nur in den Epithelzellen des Dünndarms, die im entzündlich veränderten Dünndarmgewebe eines SIV-infizierten Rhesusaffen vermehrt zu sein scheint. Nach stabiler Transfektion eines Rhesusaffen-MIC3-Gen tragenden Cosmid-Klons in Maus-L-Zellen konnte die MIC3-Expression an der Zelloberfläche festgestellt und die Lysierbarkeit der MIC3-exprimierenden Mauszellen durch LAK-Zellen sowohl des Rhesusaffen als auch des Menschen gezeigt werden. Unter Verwendung MIC-Gen-tragender Cosmid-Klone des Rhesusaffen wurden MIC2- bzw. MIC3-transgene Mäuse erzeugt. Mittels Northernblot liess sich in MIC2-transgenen Tiere die Expression des Transgens lediglich im Testis, in den MIC3-transgenen Tieren zusätzlich in Leber, Milz, Lunge, Dickdarm und Thymus nachweisen. Durch RT-PCR war eine Expression des MIC3-Transgens in allen getesteten Organen detektierbar. In Subpopulationen der Milz- und Thymuszellen konnte die MIC3-Expression auch auf Protein-ebene gezeigt und zur Etablierung spezifischer Anti-MIC-Antiseren genutzt werden. In Wildtyp-Mäusen ließen sich Anti-MIC-Antikörper nachweisen, die durch Verpaaren mit MIC3-transgenen Mäusen bzw. nachfolgender Schwangerschaft hervorgerufen wurden. Obwohl im Promotorbereich von MIC2 und MIC3 Hitzeschockelemente identifiziert werden konnten, liess sich eine Zunahme der MIC-Expression auf RNA- und Proteinebene nach Hitzeschock nicht nachweisen.

Schlagerworte: Rhesusaffe, MIC-Gene, MIC-transgene Mäuse

II. Abstract

The aim of this study was to investigate the expression of MIC genes from rhesus macaques.

A presence/absence polymorphism for the three known MIC genes in rhesus macaques, MIC1, MIC2 and MIC3, was revealed by PCR. Of the examined individuals 33% carried all three, 27% two, and 40% only one of the MIC genes. In an EBV-transformed B cell line of rhesus macaque origin the simultaneous expression of all three MIC genes could be shown for the first time and was confirmed in tissues of rhesus macaques. Moreover, this is the first demonstration of MIC expression in B cells. By northern blot analysis MIC expression could be shown in rhesus macaque testis, spleen, small intestine, stomach and large intestine, whereas by RT-PCR MIC expression was detected in all tissues tested. At the protein level MIC expression was found on epithelial cells of the small intestine, which was increased in the inflamed intestine of an SIV-infected rhesus macaque.

After stable transfection of mouse L cells with a cosmid clone carrying the MIC3 gene of the rhesus macaque, MIC3 expression could be shown on the cell surface that conferred susceptibility to lysis by LAK cells of rhesus macaque and human origin.

By using cosmid clones carrying MIC genes of the rhesus macaque, MIC2 and MIC3 transgenic mice were established. Northern blot analysis of MIC2 transgenic animals demonstrated expression of the transgene only in testis, whereas in the MIC3 transgenic mice additional MIC expression was observed in liver, spleen, lung, large intestine and thymus. Using RT-PCR, expression was detectable in all tissues tested. In subpopulations of spleen and thymus cells from MIC3 transgenic mice MIC expression could be shown at the protein level. These cells were used to establish specific MIC-antisera. Moreover specific anti-MIC antibodies could be detected in wildtype mice that had been mated with MIC3 transgenic males. Despite the identification of heat shock elements in the promoter region of the MIC2 and MIC3 genes no increased MIC expression at the RNA or protein level could be detected after heat shock.

Keywords: Rhesus macaque, MIC genes, MIC transgenic mice

III. Verzeichnis der Abkürzungen

Aminosäurebezeichnungen (Einbuchstaben-Code)

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
cps	Zerfälle pro Sekunde (counts per second)
DAB	Diaminobenzidin

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyant
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethylsulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HS	Hitzeschock
HSP	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunden
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PJ	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	simian immunodeficiency virus
SOB-Medium	Hefe-Tryptone-Salz-Medium
SOC-Medium	glukosehaltiges SOB-Medium
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroximethyl)-aminomethan
U	Unit
utr	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex, MHC) wurde erstmals im Zusammenhang mit Blutgruppen- und Transplantationsuntersuchungen an Inzuchtmäusen beschrieben (GORER, 1936). Diese etwa 3,8 Mb große Region ist beim Menschen auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert. Mit 224 Genen, von denen 128 vermutlich exprimiert werden, ist der MHC die wohl genreichste Region des menschlichen Genoms (THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999). Obwohl noch nicht von allen 128 exprimierten Genen die Funktion bekannt ist, wird angenommen, dass etwa 40 % der exprimierten Gene im MHC eine Funktion im Immunsystem haben.

Die wohl am eingehendsten untersuchten Gene im MHC des Menschen bilden die Familie der sogenannten MHC-Klasse-I-Gene, die sich in sogenannte klassische und nichtklassische MHC-Klasse-I-Gene unterteilen. Die klassischen MHC-Klasse-I-Gene werden häufig auch als MHC-Klasse-Ia-Gene bezeichnet, während die nichtklassischen MHC-Klasse-I-Gene als Klasse-Ib-Gene bezeichnet oder noch weiter in MHC-Klasse-Ib-, MHC-Klasse-Ic- und MHC-Klasse-Id-Gene unterteilt werden (HUGHES et al., 1999).

Im Menschen finden sich drei MHC-Klasse-Ia-Gene, die als HLA-A, -B und -C bezeichnet werden. Diese Gene kodieren für Membran-Glykoproteine, die auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltiger Zellen zu finden sind. Sie bestehen aus einer schweren oder α -Kette, die von dem Klasse-I-Gen kodiert wird, und dem nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin (β_2m), dessen kodierendes Gen nicht im MHC liegt. Die Bindung an das β_2m ist essentiell wichtig für die Stabilität des Klasse-I-Moleküls an der Zelloberfläche. Das Klasse-I-Molekül besteht aus vier extrazellulären Domänen, von denen drei durch die α -Kette und die vierte vom β_2m gebildet werden. Das β_2m und die α_3 -Domäne besitzen eine immunglobulinähnliche Struktur, während die α_1 - und α_2 -Domänen am aminoterminalen Ende des Moleküls eine Grube bilden, deren Boden durch eine β -Faltblattstruktur und deren Seiten durch zwei α -Helices begrenzt werden (BJØRKMAN et al., 1987a, 1987b). In dieser Grube werden Peptide von in der

Regel neun Aminosäuren Länge aus dem Innern der Zelle an der Zelloberfläche CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Auf diese Weise können die T-Zellen erkennen, ob in einer Zelle körperfremde Proteine prozessiert werden, die z.B. von Viren stammen können. In einem solchen Fall wird die infizierte Zelle dann lysiert. Mit dieser Funktion erklärt sich auch der überaus hohe Grad an Polymorphismus dieser Gene (mehr als 200 Allele für HLA-A, mehr als 500 für HLA-B und mehr als 100 für HLA-C), die es nicht nur einem Individuum, sondern vor allem auch einer Population ermöglicht, ein fast unendliches Spektrum an Peptiden zu präsentieren.

Die meisten nichtklassischen MHC-Klasse-I-Gene sind den klassischen strukturell sehr ähnlich, zeigen ansonsten jedoch deutliche Unterschiede. Zu den MHC-Klasse-Ib-Genen zählen im Menschen HLA-E, -F und -G, die noch im MHC liegen, jedoch geringen Polymorphismus aufweisen und auch nur bestimmte Peptide präsentieren. Auch die als MHC-Klasse-Ic-Gene zusammengefassten MICA und MICB sowie das HFE-Gen liegen noch innerhalb des MHC oder zumindest auf dem gleichen Chromosom, während die MHC-Klasse-Id-Gene FCGRT, AZGP1, MR1 und CD1 auf anderen Chromosomen liegen. Allein die MIC-Gene MICA und MICB weisen unter den nichtklassischen MHC-Klasse-I-Genen einen deutlichen Grad an Polymorphismus auf.

1.2 MIC-Gene des Menschen

1.2.1 Allgemeines

Die MIC-Gene sind von BAHRAM et al. (1994), wobei der Name ursprünglich für MHC class I chain-related genes steht, und parallel von LEELAYUWAT et al. (1994) als PERB11-Gene beschrieben worden.

Die MIC-Moleküle gleichen in ihrem Aufbau den Klasse-I-Molekülen, das heißt sie besitzen drei extrazelluläre Domänen (α 1- α 3) sowie eine transmembrane und eine zytoplasmatische Region. Jedoch zeigen sie auf der Ebene der Aminosäuresequenz lediglich 15-35 % Übereinstimmung mit den Klasse-I-Genen. Außerdem sind die MIC-Moleküle, anders als die Klasse-Ia-Moleküle,

nicht mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert (GROH et al., 1996). Beim Menschen gibt es im ganzen 7 verschiedene MIC-Gene, von denen jedoch nur MICA und MICB exprimiert werden, während MICC, MICD, MICE, MICEF und MICG Pseudogene sind (SHIINA et al., 1999, THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999).

Ähnlich wie die klassischen Klasse-I-Gene und anders als andere nichtklassische Klasse-I-Gene weisen die MIC-Gene einen hohen Grad an Polymorphismus auf. So sind für MICA bisher 54 und für MICB 17 Allele beschrieben (AHMAD et al., 2002). Offenbar ist dieser Polymorphismus jedoch nicht wie bei den Klasse-Ia-Genen mit der Präsentation von Peptiden assoziiert, denn bisher sind keine in der Grube der MIC-Proteine gebundenen Moleküle nachgewiesen worden (GROH et al., 1998).

Ebenfalls anders als die klassischen Klasse-I-Gene, die ubiquitär exprimiert werden, findet man die MIC-Moleküle nur in bestimmten Geweben exprimiert, wie Epithelzellen und epithelialen Tumoren (GROH et al., 1998, ZWIRNER et al., 1998, GROH et al., 1999). Jedoch ist das Vorkommen von MIC-RNA noch für eine Reihe weiterer Organe beschrieben, wie Thymus, Testis, Lunge oder Leber (LEELAYUWAT et al., 1994).

Die bisherigen Untersuchungen an verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass die MIC-Gene in einer ganzen Reihe von Säugetieren konserviert sind wie nichtmenschlichen Primaten, aber auch in Ziege, Schwein, Kuh, Hund und Hamster (BAHRAM et al., 1994). In der Maus hingegen fehlen die MIC-Gene (BAHRAM et al. 1994). Allerdings sind kürzlich zwei Gene in der Maus beschrieben worden, die zwar nicht wie die MIC-Gene im MHC der Maus liegen, sondern in der Nähe des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (LRC) auf Chromosom 7. Diese als Mill1 und Mill2 (MHC class I-like located near the LRC) bezeichneten Gene zeigen in Genbaumanalysen mit verschiedenen Klasse-I-Genen die größte Ähnlichkeit zu den MIC-Genen (KASAHARA et al., 2002). Funktionelle Untersuchungen zur Bestätigung der Vermutung, dass es sich bei den Mill-Genen um das Mausäquivalent zu den MIC-Genen handelt, stehen jedoch noch aus.

1.2.2 Funktion

Die Entdeckung von Hitzeschockelementen, die denen von HSP70-Genen gleichen, im Promotor der MIC-Gene und die Bestätigung, dass die MIC-Expression in HeLa-Zellen durch Hitzeschock verstärkt werden kann, führte zu der Vermutung, dass es sich bei den MIC-Molekülen um Zellstress-Anzeiger handelt, die mit einer bestimmten Population von T-Zellen interagieren (GROH et al., 1996). Diese Vermutung bestätigte sich, als gezeigt werden konnte, dass die MIC-Moleküle von einem bestimmten Subtyp von $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden, den V δ 1- $\gamma\delta$ T-Zellen. Zu diesem Befund passte auch, dass der V δ 1-Subtyp 70-90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmepithel ausmacht, was sich mit der Expression der MIC-Moleküle in diesem Bereich deckt (GROH et al., 1998). Als Rezeptor für das MIC-Molekül wurde NKG2D identifiziert, ein aktivierendes Mitglied einer Gruppe von C-Typ-Lektinen, das mit dem Adaptormolekül DAP10 assoziiert ist. Dieser Rezeptor findet sich sowohl auf den V δ 1- $\gamma\delta$ T-Zellen als auch auf CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen und fast allen NK-Zellen, was ihn zu einem der am weitesten verbreiteten NK-Zell-Rezeptoren macht (BAUER et al., 1999).

Interessante Einsichten in die Interaktion von MIC mit anderen Molekülen ergab die Kristallstruktur des MICA-Moleküls, denn anders als erwartet zeigt die Grube der α 1- α 2-Domäne nicht in Richtung Interzellularraum, um – wie bei klassischen Klasse-I-Molekülen – einen möglichst guten Kontakt zu dem T-Zell-Rezeptor zu ermöglichen, sondern ist um etwa 113,5° geneigt und zeigt damit eher zur Zellmembran (LI et al., 1999). Allerdings scheint die Struktur des Moleküls besonders im Bereich des Übergangs von der α 3-Domäne zu der α 1- α 2-Plattform recht flexibel zu sein, was die Möglichkeit einer Rekonfiguration bei der Interaktion mit dem NKG2D-Rezeptor offen lässt. Diese Rekonfiguration konnte durch die Kristallisation von MICA als Komplex mit NKG2D bestätigt werden. Es kommt dann zu einem Rearrangement um 96°, so dass die polymorphe Oberseite der α 1- α 2-Plattform mit dem NKG2D-Molekül in Kontakt tritt (LI et al., 2001).

Durch die MIC-Expression in Epithelzellen (vor allem des Darms und der Haut) und durch die unmittelbare Nähe des MICA-Gens zum HLA-B-Locus im MHC, einem Bereich der mit verschiedenen Krankheiten assoziiert ist, wurde vielfältig die Assoziation von MICA vor allem mit Krankheiten des Darms oder der Haut untersucht. So wurde u.a. eine Assoziation des MICA*009-Allels mit Morbus Behçet nachgewiesen, einer chronisch-entzündlichen Erkrankung vor allem der Haut und Schleimhäute (WALLACE et al., 1999). Inzwischen wurde eine ganze Reihe von weiteren Krankheiten auf eine Assoziation mit bestimmten MIC-Allelen hin untersucht, wie Morbus Crohn (GLAS et al., 2001), ulzerative Colitis (ORCHARD et al., 2001), Typ I Diabetes (SHTAUVERE-BRAMEUS et al., 2002), rheumatoide Arthritis (MARTINEZ et al., 2001), Psoriasis (TAY et al., 2000), Morbus Addison (GAMBELUNGHE et al., 1999) oder Familiäres Mittelmeerfieber (TOUITOU et al., 2001). Es bleibt aber offen, wieweit die MIC-Assoziation ein Sekundäreffekt der Assoziation mit anderen benachbarten Genen ist. Weiter wurde entdeckt, dass MIC in Karzinomen von Lunge, Brust, Niere, Ovar, Prostata und Kolon exprimiert wird (GROH et al. 1999). Zusätzlich fand sich ein verstärktes Auftreten von V δ 1- γ δ T-Zellen in den Karzinomen mit MIC-Expression gegenüber denen ohne MIC-Expression und der Nachweis der Lysierbarkeit der MIC-exprimierenden Tumorzellen durch die V δ 1- γ δ T-Zellen (GROH et al. 1999).

Darüber hinaus gibt es auch Anzeichen, dass die MIC-Moleküle eine Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten haben, da bei Patienten nach einer Organabstoßung Antikörper gegen MIC nachgewiesen werden konnten (ZWIRNER et al., 2000). Auch konnte in abgestoßenen Nieren- und Pankreastransplantaten die Expression von MIC-Molekülen dargestellt werden (HANKEY et al., 2002).

Im Hinblick auf die offenbar doch recht bedeutende Rolle, die die MIC-Gene im natürlichen Immunsystem einnehmen, war es überraschend, dass es bei dem in einigen ethnischen Gruppen am weitesten verbreiteten MICA-Allel MICA008/5.1 durch eine Punktmutation zu einer Verschiebung des Leserahmens und dadurch zu einem vorzeitigen Stop-Kodon in der transmembranen Region kommt (Mizuki et al., 1997). Damit fehlt dem entsprechenden MIC-Molekül die cytoplasmatische Region. In dieser Region liegt jedoch ein Motiv, dass dafür

verantwortlich ist, dass die MIC-Moleküle in den polarisierten Epithelzellen des Darms an die basolaterale Oberfläche der Zellen gebracht werden. Die MIC-Moleküle, die von diesem Allel kodiert werden, werden jedoch an die apikale Zelloberfläche transportiert, was die Funktion dieser MIC-Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinträchtigt (SUEMIZU et al., 2002). Bisher ist jedoch nicht untersucht worden, ob der völlige Verlust von funktionellen MICA-Molekülen bei MIA*008/5.1 homozygoten Individuen durch die MICB-Moleküle kompensiert wird.

Ein völliges Fehlen von funktionellen MIC-Genen ist für den in Südostasien häufig auftretenden HLA-B*4801-Haplotyp beschrieben. In diesem Haplotyp fehlt das MICA-Gen durch eine Deletion der umgebenden 100 kb des MHC, und das MICB-Gen weist ein Stop-Kodon in der α_2 -Domäne auf (KOMATSU-WAKUI et al., 1999, 2001).

Es zeigt sich also, dass die MIC-Gene beim Menschen eine bedeutende Rolle im natürlichen Immunsystem spielen und offenbar mit einer ganzen Reihe verschiedener Krankheiten assoziiert sein könnten. Auf der anderen Seite gibt es in bestimmten ethnischen Gruppen eine Vielzahl von Menschen, die nur ein oder sogar kein funktionelles MIC-Gen besitzen, was zeigt, dass die genaue Funktion der MIC-Gene noch weiterer Aufklärung bedarf.

1.3 MIC-Gene des Rhesusaffen

Rhesusaffen sind ein wichtiges Modell zur Untersuchung von Krankheiten, wobei eine besondere Bedeutung SIV-infizierten Rhesusaffen in der AIDS-Forschung zukommt (KENT et al., 2001, O'CONNOR et al., 2001). Aber auch in der Untersuchung anderer Erkrankungen spielen die Rhesusaffen eine wichtige Rolle, wie z.B. in der Erforschung der Multiplen Sklerose, für die die Experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) in Rhesusaffen als ein Modell dient (BROK et al., 2001). Weiter sind hier Untersuchungen an Rhesusaffen mit Lyme Neuroborreliose zu nennen, um detailliert die Reaktionen des Immunsystems auf die verantwortlichen Erreger zu untersuchen (PACHNER, 2001). Ein wichtiges Modell stellt der Rhesusaffe

auch in der Transplantationsforschung dar (KNECHTLE et al., 2001), was auch ein detailliertes Wissen über die MHC-Gene voraussetzt, die zentral an der Abstoßung von Organen beteiligt sind (DOXIADIS et al., 2001).

Es ist also von großer Bedeutung für den Einsatz des Rhesusaffen als Krankheitsmodell möglichst umfangreiche Kenntnisse über sein natürliches und adaptives Immunsystem und die daran beteiligten Gene zu besitzen, zu denen auch die MIC-Gene gehören.

Im Rhesusaffen sind bisher drei funktionelle MIC-Gene beschrieben worden, die als Mamu-MIC1, Mamu-MIC2 und Mamu-MIC3 bezeichnet werden (STEINLE et al., 1998, SEO et al., 1999). Sequenzvergleiche dieser drei MIC-Gene mit menschlichen MICA- und MICB-Sequenzen machen eine strikte orthologe Beziehung zwischen den menschlichen und den Rhesusaffen-MIC-Genen unwahrscheinlich (SEO et al., 1999, 2001). Dennoch konnte gezeigt werden, dass die MIC-Moleküle der Rhesusaffen von menschlichen V δ 1- γ δ T-Zellen erkannt und die MIC-exprimierenden Zellen durch die γ δ T-Zellen lysiert werden (STEINLE et al., 1998). Darüber hinaus ist über die Expression oder Funktion der MIC-Gene im Rhesusaffen aber wenig bekannt.

Neben den drei exprimierten MIC-Genen findet sich im Rhesusaffen noch ein MIC-Gen, Mamu-MICD, welches wie das MICD-Gen des Menschen ein Pseudogen ist (SEO et al., 2001).

Das Screening einer Rhesus-Cosmid-Bank und PCR-Untersuchungen an der genomischen DNA des Individuums, aus dem die Cosmid-Bank konstruiert wurde, zeigten, dass dieser Affe nur Gene für MIC2 und MIC3 aufwies und ihm das MIC1-Gen fehlte (SEO et al., 2001). Es ergibt sich also, dass es bei den Rhesusaffen wie bei den Menschen Individuen gibt, denen MIC-Gene fehlen. Untersuchungen an Tieren, denen MIC-Gene fehlen oder die sogar kein funktionelles MIC-Gen mehr besitzen, könnten hilfreich sein, die Auswirkungen eines solchen Haplotyps zu untersuchen und dadurch möglicherweise auch Erkenntnisse für den Menschen zu gewinnen.

1.4 Ziele der Arbeit

Auf der Basis der bereits in der Abteilung Immungenetik der Universität Göttingen durchgeführten Untersuchungen an Rhesusaffen (SEO et al., 1999, 2001) sollte zunächst sowohl auf RNA-Ebene als auch auf der Proteinebene die MIC-Expression im Rhesusaffen ermittelt werden. Dazu sollten zunächst verschiedene Gewebe des Rhesusaffen mit Northernblotanalysen und RT-PCR auf das Vorhandensein von MIC-RNA untersucht werden. Später sollten dann Paraffinschnitte möglichst aller Gewebe mit einem Anti-MIC-Antikörper auf die Expression von MIC-Molekülen getestet werden.

Da es zu Beginn dieser Untersuchung keine Anti-MIC-Antikörper für den Rhesusaffen gab, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls etabliert werden.

Ein Problem vor allem bei funktionellen Untersuchungen der MIC-Gene des Rhesusaffen ist die eingeschränkte Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials von diesen Tieren. Daher sollte eine für MIC-Gene von Rhesusaffen transgene Mauslinie etabliert werden. Da Mäuse selber keine MIC-Gene besitzen, bestand die Hoffnung, dass eine MIC-exprimierende Mauslinie ein wertvolles Hilfsmittel und Modell für die weitere Analyse der Rhesusaffen-MIC-Gene sein könnte.

2. Material

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Rhesusaffen

Die für diese Arbeit verwendeten Rhesusaffenproben stammen fast alle aus dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Die gefrorenen Gewebeproben und die Paraffinschnitte wurden von Prof. F.-J. Kaup aus der Abteilung Veterinärmedizin und Primatenhaltung, die B-Zelllinie 1641 von Dr. Ulrike Sauer mann aus der Abteilung Virologie und Immunologie, die Blutproben von Dr. C. Stahl-Hennig aus der Abteilung Virologie und Immunologie und die DNA-Proben von Christian Roos aus der Abteilung Primatengenetik zur Verfügung gestellt. Die Rhesusaffen-Zelllinie 3c stammt von Dr. R. Bontrop vom Biomedical Primate Research Centre in Rijswijk, Niederlande.

Tab. 1: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Rhesusaffenproben

Tiernummer	Geschlecht	Material
1801	weiblich	Gefrorene Gewebeproben
6442	männlich	Gefrorene Gewebeproben
6197	männlich	Gefrorene Milz
6572	weiblich	Gefrorene Milz
6574	weiblich	Gefrorene Milz
6575	weiblich	Gefrorene Milz
6576	männlich	Gefrorene Milz
6577	weiblich	Gefrorene Milz
1641	?	B-Zell-Linie
6197	männlich	Paraffinschnitte
6283	männlich	Paraffinschnitte
1610	?	peripheres Blut
1622	?	peripheres Blut
1660	?	peripheres Blut
9306	?	peripheres Blut

10037	?	peripheres Blut
10670	?	peripheres Blut
10926	?	peripheres Blut
10940	?	peripheres Blut
10942	?	peripheres Blut
11106	?	peripheres Blut
11111	?	peripheres Blut
11112	?	peripheres Blut
11118	?	peripheres Blut
1666	?	DNA
016	weiblich	DNA
037	weiblich	DNA
038	weiblich	DNA
039	weiblich	DNA
040	weiblich	DNA
043	weiblich	DNA
044	weiblich	DNA
045	weiblich	DNA
046	männlich	DNA
047	männlich	DNA
048	männlich	DNA
051	weiblich	DNA
122	weiblich	DNA
123	männlich	DNA
124	weiblich	DNA
125	weiblich	DNA
126	männlich	DNA
130	männlich	DNA
141	männlich	DNA
1030	?	DNA
1893	?	DNA
3c	?	Zelllinie

2.1.2 Mäuse

Zur Etablierung von MIC-transgenen Mäusen wurden im MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen Pronukleusinjektionen bei befruchteten Eizellen von Mäusen des Inzuchtstammes FVB und die anschließenden Embryotransfers durchgeführt. Auf diese Weise wurden 5 männliche und 7 weibliche MIC3-transgene Founder sowie 6 männliche und 3 weibliche MIC2-transgene Founder generiert. Diese Tiere wurden in die Versuchsterräume der Abteilung Immungenetik übernommen.

Für die Verpaarung dieser Foundermäuse wurden FVB/NCrIBR-Mäuse (Charles River Laboratories) benutzt.

Die für die Immunisation mit L-Zellen verwendeten C3H/HeJ-Mäuse stammen aus eigener Zucht.

2.2 Verwendete Zelllinien

2.2.1 Eukaryotische Zellen

Für die Transfektion mit den zu untersuchenden MIC-Genen wurde eine L-Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie, die aus dem C3H-Inzuchtstamm stammt. Diese Zellen wachsen in beschichteten Zellkulturschalen adhärent, in unbeschichteten aber auch in Suspension.

Desweiteren wurde die menschliche Erythroleukämie-Linie K562 verwendet. Diese Zellen wachsen ausschließlich in Suspension. Da sie keine MHC-Klasse-I-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren, sind sie besonders suszeptibel für die Lyse durch humane NK-Zellen und dienen daher als Positivkontrolle in Chromfreisetzungstests mit menschlichen NK-Zellen (siehe 3.16).

Für die Fusion der Lymphozyten zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers wurde die Linie X63-Ag8.653 (653) verwendet, die aus einem Myelom der BALB/c-Maus stammt. Diese Linie hat einen Defekt des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT), wodurch die Zellen unfusioniert in HAT-Medium sterben. Außerdem produzieren sie keine eigenen Immunglobulinketten mehr.

2.2.2 Prokaryotische Zellen

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden E. coli-Bakterien des Stammes DH10B verwendet.

2.3 Verwendete Materialien

2.3.1 Verwendete Chemikalien

Agar	GIBCO BRL GmbH
Agarose, NEEQ Ultra Qualität	Roth GmbH & Co. KG
Biophenol, TRIS-stabilisiert, pH7,8-8,0	Biomol Feinchemikalien GmbH
Borsäure, p.A.	Merck KGaA
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA (Fraktion V)	Biomol Feinchemikalien GmbH
Chloroform, p.A.	Merck KGaA
Collagenase Typ CLS IV (260 U/mg)	Biochrom AG
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dextransulfat	Amersham Biosciences AB
DMEM	Biochrom AG
DMSO, getrocknet, p.A.	Merck KGaA
EDTA, p.A.	Roth GmbH & Co. KG
Entwickler LX 24	Kodak, über Intas
Essigsäure 100 %, p.A.	Merck KGaA
Ethanol 99,9%, vergällt	Klinikumsapotheke
Ethanol, absolut	Merck KGaA
Ethidiumbromid, 1 %ige Lösung	Merck KGaA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Ficoll (Biocoll Separating Solution)	Biochrom AG
Ficoll PM400	Amersham Biosciences GmbH
Fixierer AL 4	Kodak, über Intas

Formaldehyd 37%	Merck KGaA
Formamid	Fluka Feinchemikalien GmbH
Glucose, p.A.	Merck KGaA
Geneticin (G418)	PAA Laboratories GmbH
Glycerin	Roth GmbH & Co. KG
Guanidinthiocyanat	Roth GmbH & Co. KG
Harnstoff, p.A.	Roth GmbH & Co. KG
HEPES	Roth GmbH & Co. KG
Heringsspermien-DNA	Roche Diagnostics GmbH
IPTG	Roth GmbH & Co. KG
Isoamylalkohol, p.A.	Merck KGaA
Isopropanol, p.A.	Merck KGaA
Kaliumacetat, p.A.	Merck KGaA
Kaliumchlorid, p.A.	Merck KGaA
Lambda-DNA (λ -DNA)	MBI Fermentas GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.A.	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p.A.	Merck KGaA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Lauroylsarcosin	Merck KGaA
Natriumacetat-Trihydrat, p.A.	Roth GmbH & Co. KG
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid, p.A.	Roth GmbH & Co. KG
Tri-Natriumcitrat (Dihydrat), p.A.	Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydrogencarbonat, p.A.	Merck KGaA
Natriumhydroxid, p.A.	Merck KGaA
Nonidet [®] P40 (NP40)	AppliChem GmbH
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen GmbH
OptiPhase 'Super Mix' (Szintillator)	PerkinElmer Life Science (Germany) GmbH
PBS	Biochrom AG
Penicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

(Tween 20)	
Polyvinylpyrrolidon	Merck KGaA
Ponceau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNAse-Inhibitor	Promega GmbH
Salzsäure, rauchend, p.A.	Merck KGaA
SDS	Roth GmbH & Co. KG
Select Peptone 140	GIBCO BRL GmbH
Select Yeast Extract	GIBCO BRL GmbH
Streptomycin Sulfate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth GmbH & Co. KG
Wasserstoffperoxid (Perhydrol)	Merck KGaA
X-Gal	Roth GmbH & Co. KG
Xylencyanol	Merck KGaA

2.3.2 Radiochemikalien

α -[³² P] dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences GmbH
⁵¹ Cr (Na ₂ CrO ₄)	ICN Biomedicals GmbH

2.3.3 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH
Superscript Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH
Proteinase K	Merck KGaA
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics GmbH
	MBI Fermentas GmbH
	Promega GmbH
RNAse A	Roche Diagnostics GmbH
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH

2.3.4 Antikörper

Fluorescein (FITC) -conjugated	Dianova mbH
AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) unconjugated	Dianova mbH
AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase-conjugated AffiniPure	Dianova mbH
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)	
RPN 1197 (Hybridomüberstand)	Erhalten von Prof. Dr. G Multhoff Abt. für Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg

2.3.5 Verwendete Kits

ABI Prism BigDye	Applied Biosystems
Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applera Deutschland GmbH
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed GmbH
JETSTAR Plasmid Maxi Kit	Genomed GmbH
Megaprime DNA labelling systems	Amersham Biosciences GmbH
QIAGEN PCR Cloning Kit	Qiagen GmbH

2.3.6 Oligodesoxyribonukleotide

Die für PCR und Sequenzierung benutzten Primer wurden von der Firma NAPS Göttingen GmbH oder der Firma Roth GmbH & Co. KG bezogen.

Tab. 2: Bezeichnung und Nukleotidsequenz der verwendeten Primer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Primersequenz</i>
MIC-5s	5' AAG TTA CTT CCA GGA AGA GGT TTC A 3'
MIC-5t	5' CCA GAA ATT CCT GAT GTT CAG AG 3'
MIC2-5e	5' CTC CTG GGA GAC CAA GAG ACC 3'
MIC-5e	5' GTC CTG GGA GCT AAG ACC TGG 3'
MIC-18	5' CAT CTT CAT AGA TCT CAC AGT T 3'
MICSonde 5'	5' CCC CCC ATG GTG AAC GTC AC 3'
MICSonde 3'	5' CAG AGG GCA CAG GGT (AG)AG TG 3'
MICSonde 1	5' TAT AAG CTT CCC CCC ATG GTG AAC GTC AC 3'
MICSonde 2	5' TAT CTC GAG AGA GGG CAC AGG GTG AGT GC 3'
MIC 5'utr	5' CAC TGC TTG AGC CGC TGA GA 3'
MICA-2	5' CTA GGC GCC CTC AGT GGA GC 3'
MIC 7	5' GCT TGC ATT CCC TCC AGG A 3'
MIC 16	5' TGG ACC CTC TGC AGC TGA TGT 3'
MIC-Bakt5'	5' TAT GGT ACC GAG C(CT)C CAC AGT CTT CGT TA 3'
MIC-Bakt3'	5' TAT AAG CTT TCA AGA GGG CAC AGG GTG AGT 3'

2.3.7 Längenstandards

DNA-Längenstandards:

λ-DNA, HindIII-geschnitten

eigene Präparation

GeneRuler DNA Ladder Mix

MBI Fermentas GmbH

Proteinlängenstandard:

High Molecular Weight Standard

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.3.8 Verwendete Vektoren

pDRIVE

Qiagen GmbH

PCR3.1

Invitrogen GmbH

pCRII

Invitrogen GmbH

DsRed

Clontech Inc.

2.3.9 Hybridisierungssonden

Zur Hybridisierung von Northern- und Southernblots wurden verschiedene Sonden hergestellt.

Hybridisierungssonde 1 wurde mit den Primern MICSonde 1 und MICSonde 2 von genomischer DNA der Rhesusaffen-Linie 3c amplifiziert, die ein 288-bp-Fragment im Exon 4 im Rhesusaffen-MIC-Gen flankieren. Das Amplifikat wurde in den pCRII-Vektor kloniert und die Sonde bei Bedarf mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I ausgeschnitten und aus einem Agarosegel eluiert. Die Sonde zeigt 100% Übereinstimmung zu MIC1*01, sowie 99 % zu MIC3*01 und 94 % zu MIC2*03.

Die Hybridisierungssonde 2 wurde mit den Primern MICBakt 5' und MICBakt3' von von cDNA des Rhesusaffen 1641 amplifiziert und umfasst die Exons 2 bis 4 von MIC3. Die Sonde zeigt 99% Übereinstimmung zu MIC1*01, sowie 95% zu MIC2*03.

2.3.10 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer membraPure-Anlage angesetzt. Je nach Bedarf wurde anschließend noch 30 min bei 121°C und 1,1 bar im Dampfautoklaven autoklaviert.

Auftrag-Puffer (DNA)	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
	25 % Ficoll PM400
	50 mM EDTA pH 8,0
Auftrag-Puffer (RNA)	50 % Glycerin
	1 mM EDTA pH 8,0
	0,4 % Bromphenolblau
	0,4 % Xylencyanol

Blotpuffer (für Westernblot)	1 x Laufpuffer mit 20 % Methanol
Denaturierungslösung (Alkalizer)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts Lösung (50x)	1 % Ficoll 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA (Fraktion V)
Erythrozytenlysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA eingestellt auf pH 7,4-7,8 autoklaviert
Hybridisierungspuffer	6x SSC 5x Denhardts Lösung 0,5 % SDS 10 % Dextransulfat
Laufpuffer (für Proteingele)	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Lösung D (Stammlösung)	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 0,5 % N-Lauroylsarcosin 0,1 M β-Mercaptoethanol
Lysepuffer (DNA-Gewinnung aus Geweben)	50 mM Tris 100 mM EDTA 0,5 % SDS

Lysis-I-Lösung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase A
Lysis-II-Lösung	1 % SDS 0,5 N NaOH
Lysis-III-Lösung	3 M NaAcetat pH 4,8
Neutralisierungslösung	3 M NaAcetat pH 5,5
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
SDS-Probenpuffer (reduzierend)	0,02 M Tris/HCl pH 8,0 10 % Glycerin 2 % SDS 5 % Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl eingestellt
TBE-Puffer (10 x)	0,5 M Tris-Borat pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer (10 x)	100 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8

2.4 Zusammensetzung der Nährmedien

2.4.1 Nährmedien für prokaryotische Zellen

LB-Medium	10 % NaCl 10 % Select-Pepton 5% Select Yeast Extract autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar autoklaviert in Petrischalen gegossen (ca. 15 ml/9-cm-Schale)
SOB-Medium	2 % Select-Pepton 0,5 % Select Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose

2.4.2 Zusätze zu Nährmedien für prokaryotische Zellen

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml): 50 mg Ampicillin pro Liter Medium

Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml): 25 mg Kanamycin pro Liter Medium

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden die Agarplatten vor Gebrauch mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) bestrichen.

2.4.3 Nährmedien für eukaryotische Zellen

E ⁺⁺ -Medium	DMEM-Medium, mit 3,7 g/Liter NaHCO ₃ gepuffert (pH 7,0) 10 % FCS Penicillin 1*10 ⁵ Units/Liter Streptomycin 100 mg/Liter 1mM Pyruvat
E+H-Medium	DMEM-Medium, mit 50 mM HEPES gepuffert (pH 7,2)

2.4.4 Zusätze zu Nährmedien für eukaryotische Zellen

Penicillin/Streptomycin (100x)	Stammlösung 1x10 ⁶ IE Penicillin 1000 mg Streptomycin ad 100 ml PBS, sterilfiltriert
Pyruvat Stammlösung (100x)	1,1 g Pyruvat ad 100 ml PBS, sterilfiltriert
ConA-Stammlösung	10 mg ConA ad 10 ml E+H-Medium, sterilfiltriert

2.5 Einwegartikel

Combitips plus 5 ml und 10 ml	Eppendorf GmbH
CryoTube Vials, 1,8 ml	Nunc GmbH & Co. KG
Einmalspritzen Ecoject 5 ml, 10 ml, 20 ml	Dispomed Witt oHG
Einmalspritze monoject 1 ml	Tyco Healthcare Deutschland GmbH
Faltenfilter, Ø 185 mm	Schleicher & Schuell GmbH
Kanüle, Sterican Ø 0,45 x 12 mm	B. Braun Melsungen AG
Klebefolie (für Sample Plates)	Perkin Elmer Inc.
Multiwellplatten (96 Well)	Costar GmbH
Nunclon MicroWell Platten,	Nunc GmbH & Co. KG

96 Well, Rundboden	
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt GmbH + Co
Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt GmbH + Co
Parafilm PM-992 Laboratory film	über: Schütt Labortechnik GmbH
Petrischalen, beschichtet und unbeschichtet, 9 cm Durchmesser	Sarstedt GmbH + Co
Pipettenspitzen	Sarstedt GmbH + Co
Polaroidfilme 667	über: Klinikumsapotheke
Röntgenfilme, Hyperfilm MP	Amersham Biosciences GmbH
50-ml-Röhrchen	Sarstedt GmbH + Co
13-ml-Röhrchen	Sarstedt GmbH + Co
5-ml-Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Becton Dickinson GmbH
Sample Plate, 96-Well	Perkin Elmer Inc.
Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Venofix, Venenpunktionsbesteck Ø 0,8 x 20 mm	B. Braun Melsungen AG

2.6 Geräte

Hochdruck-Dampfsterilistor Typ C und Typ A40 (Tischautoklav)	Webeco GmbH & Co. KG
Autoradiographiekassette, Cronex- Cassetten	Du Pont de Nemours GmbH
Brutschränke, CO ₂ -begast	Heraeus Sepatech GmbH
Digital pH-Meter CG 837	Schott-Geräte GmbH über: Roth GmbH & Co. KG
Elektrophoresekammern:	
Agagel Mini	Biometra GmbH
Easycast B1A	Peqlab Biotchnologie GmbH
Owl B2	Peqlab Biotchnologie GmbH
Vertical Gel Electrophoresis System	Invitrogen GmbH

Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500	Dr. L. Fischer
FACScan Durchflußzytometer	Becton Dickinson GmbH
Hamiltonspritze	über: Schütt Labortechnik GmbH
Handmonitor, Typ LB 1210 B	Laboratorium Prof. Dr. Berthold
Heizblock, Liebisch, Typ S-12-140	Gebr. Liebisch Bielefeld über: Schütt Labortechnik GmbH
Hybridisierungsöfen, Typ 430	Bachofer GmbH
LaminAir® Werkbank HLB 2448	Heraeus Sepatech GmbH
Minishaker, Typ MS1	IKA über: Krannich GmbH & Co. KG
 Netzteile:	
Consort Electrophoresis Power Supply	Fröbel Labortechnik GmbH
2197 Power Supply	Pharmacia Biosystems GmbH
Peristaltikpumpe, IKA® Schlauch- pumpe PA-SF	Jahnke & Kunkel IKA Labortechnik über: Rettberg GmbH
Photometer, Ultrospec II	Pharmacia Biosystems GmbH
Polaroid-Kamera CU-5	Polaroid GmbH
Rundschüttler, IRC-1-U Clim-O-Shake	Adolf Kühner AG Apparatebau
Sequenziergerät ABI 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH
Stabhomogenisator, Art-Miccra D-8	Art Labortechnik über: SBS, Selective Bench Service
 Thermocycler:	
Biometra T-personal	Biometra GmbH
GeneAmp (2700)	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH
Trilux 1450 MicroBeta®, liquid scintillation and luminiscence counter	Wallac über: Perkin Elmer Life Science (Germany) GmbH
UV-Durchleuchter, Fluo-link Typ CL1	Biometra GmbH
UV-Handlampe	Vetter GmbH

Vakuumanlage:

Pumpe VP 200, SpeedVac SC 110	Savant über: Thermo Biosciences GmbH
Kühlfalle RVT 100	über: Schütt Labortechnik GmbH

Waagen:

Typ 1574 MP 8	Sartorius GmbH
Typ BP 61	Sartorius GmbH

Wasserbäder:

Julabo V3	W. Krannich GmbH & Co. KG
Multitemp II (Kryostat-Wasserbad)	Amersham Biosciences GmbH
Schüttel-Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. über: Schütt Labortechnik GmbH

Zentrifugen:

Labofuge GL, Rotor Nr. 2150	Heraeus Sepatech GmbH
Minifuge GL, Typ 4400, Rotor Nr. 2150	Heraeus Sepatech GmbH
Sigma 3K30 Tischkühlzentrifuge, Rotor Nr. 12153	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Varifuge 3.2 RS, Rotor Nr. 5315	Heraeus Sepatech GmbH
Mikro 22	Hettich GmbH & Co. KG über: W. Krannich GmbH + Co. K.G.

2.7 Herstelleradressen

Adolf Kühner AG Apparatebau	Dinkelbergstr. 1, 4127 Birsfelden, Schweiz
Amersham Biosciences GmbH	Munzinger Str. 9, 79111 Freiburg
Applied Biosystems	Frankfurter-Strasse 129 B, 64293 Darmstadt
Applera Deutschland GmbH	Ottoweg 10b, 64291 Darmstadt
AppliChem GmbH	Postfach 7089, 72770 Reutlingen
Bachofer GmbH	Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg
Becton Dickinson GmbH	

Biochrom AG	Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin
Biometra GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 30, 37079 Göttingen
Biomol Feinchemikalien GmbH	Waidmannstr. 35, 22769 Hamburg
B. Braun Melsungen AG	Carl-Braun-Str. 1, 34212 Melsungen
Charles River Laboratories	Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld
Clontech Inc.	Tullastr. 4, 69126 Heidelberg
Costar GmbH	Am Kümmerling 21-25, 55294 Bodenheim
Dianova mbH	Mittelweg 176, 20148 Hamburg
Dispomed Witt oHG	Am Spielacker 10-12, 63571 Gelnhausen
Dr. L. Fischer	Schneidmühlstr. 9, 69115 Heidelberg
Du Pont de Nemours GmbH	Sägewerkstr. 3, 83395 Freilassing
Eppendorf GmbH	Friedensstrasse 116, 51145 Köln
Fluka Feinchemikalien GmbH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Grünwalder Weg 30, 82041 Deisenhofen
Fröbel Labortechnik GmbH	Alwindstr. 4, 88131 Lindau
Genomed GmbH	Wielandstr. 28a, 32545 Bad Oeynhausen
GIBCO BRL GmbH	über: Invitrogen GmbH
Heraeus Sepatech GmbH	Postfach 1220, 37520 Osterode
ICN Biomedicals GmbH	Thüringer Str. 15, 37269 Eschwege
Invitrogen GmbH	Emmy-Noethern-Str. 10, 76131 Karlsruhe
Intas	Florenz-Sartorius-Str.14, 37079 Göttingen
Klinikumsapotheke der Universität Göttingen	Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen
Krannich GmbH & Co. KG	Elliehäuser Weg 17, 37079 Göttingen
Laboratorium Prof. Dr. Berthold	Siemensstr. 4, 30173 Hannover
MBI Fermentas GmbH	Opelstr. 9, 68789 St. Leon-Rot
Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt

NAPS Göttingen GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen
Nunc GmbH & Co. KG	Hagenauer Str. 21a, 65203 Wiesbaden
PAA Laboratories GmbH	Unterm Bonrain 2, 35091 Cölbe
Peqlab Biotechnologie GmbH	Carl-Thiersch-Str. 2b, 91052 Erlangen
PerkinElmer Life Science (Germany) GmbH	Ferdinand Porsche Ring 17, 63110 Rodgau - Jügesheim
Polaroid GmbH	Sprendlinger Landstr. 109, 63069 Offenbach
Promega GmbH	Schildkrötstr. 15, 68199 Mannheim
Qiagen GmbH	Max-Volmer-Str. 4, 40724 Hilden
Rettberg GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 17, 37079 Göttingen
Roche Diagnostics GmbH	Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
Roth GmbH & Co. KG	Schoeperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe
Sarstedt GmbH & Co	Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Sartorius GmbH	Weender Landstr. 94-108, 37079 Göttingen
SBS, Selective Bench Service	Sandhecke 15, 37133 Friedland
Schleicher & Schuell GmbH	Postfach 1111, 37582 Dassel
Schütt Labortechnik GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 11, 37079 Göttingen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen
Sigma Laborzentrifugen GmbH	An der unteren Söse 50, 37520 Osterode
Thermo Biosciences GmbH	Sedanstr. 18, 89077 Ulm
Tyco Healthcare Deutschland GmbH	Gewerbepark 1, 93333 Neustadt/Donau
Vetter GmbH	Horrenbergerstr. 48, 69186 Wiesloch- Baiertal
Webeco GmbH & Co. KG	Mühlenstr. 38, 23611 Bad Schwartau

3. Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Präparation von genomischer DNA aus kleinen Gewebemengen

Bei dieser Methode werden ca. 100 bis 500 mg homogenisiertes Gewebe (z.B. Schwanz, Leber, Niere) oder ca. 10 Millionen Zellen in 700 µl DNA-Lysepuffer und 35 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag werden zunächst durch Mischen des Lyseansatzes mit 700 µl Phenol und einer Zentrifugation bei 10.000 x g (Tischzentrifuge) für 3 min die Proteine entfernt. Anschließend wird die DNA-haltige obere Phase abpipettiert, mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen und erneut für 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 70 µl 3 M NaAc (pH 5,5) und 700 µl absolutem Ethanol präzipitiert. Die DNA wird durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 min sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in bidestilliertem Wasser gelöst.

3.1.2 Präparation von RNA (CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987)

Zur Gewinnung von RNA werden ca. 400 mg Gewebe oder ca. 40×10^6 Zellen in 4 ml Gebrauchslösung D gegeben. Das Gewebe wird mit einem Stabhomogenisator homogenisiert. Zu dieser Lösung gibt man nacheinander 400 µl 2 M NaAc (pH 4,0), 4 ml Phenol und 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzu. Das Gemisch vortext man für 10 s und lässt es dann 15 min auf Eis inkubieren. Anschließend zentrifugiert man 20 min bei 3000 x g (Minifuge GL) und 4°C, wodurch sich zwei Phasen trennen, von denen die obere Phase die RNA enthält. Von dieser Phase überführt man sechs mal 660 µl in 1,5 ml Reagiergefäße, gibt jeweils 660 µl Isopropanol dazu und lässt das Gemisch eine Stunde bei -20°C präzipitieren. Die ausgefallene RNA wird durch 15 min Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert und mit 75 % Ethanol

gewaschen. Nach dem Trocknen wird die RNA je nach Ausbeute in jeweils 10-20 µl Formamid aufgenommen.

3.1.3 Kleinansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Drei ml LB-Medium, die je nach Resistenz der Bakterien mit Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) versetzt sind, werden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 210 rpm auf dem Rundschtüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden 2 ml der Bakteriensuspension für 5 min bei 10.000 x g (Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgenommen und das Sediment in 150 µl Lysis-I-Lösung resuspendiert. Anschließend werden 150 µl Lysis-II-Lösung zugegeben und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Ausfällen der Proteine werden 150 µl Lysis-III-Lösung zugegeben, das Gemisch für 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 20 min mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert. 400 µl des Überstands werden abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird mit 800 µl absoluten Ethanol bei -60°C für 5 min präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 20 min wird die DNA sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Ausbeute liegt bei dieser Methode bei etwa 10-20 µg Plasmid-DNA.

3.1.4 Großansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präp)

Bei dieser Methode werden für *high copy* Plasmide 100 ml LB-Medium mit ca. 50 µl eines Bakterienstocks angeimpft und über Nacht bei 37°C und 210 rpm auf dem Rundschtüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Bakteriensuspension auf zwei 50-ml-Röhrchen aufgeteilt und die Bakterien für 20 min bei 3000 x g sedimentiert. Währenddessen wird eine der Säulen aus dem JETSTAR Plasmid Maxi Kit mit 30 ml Lösung E4 äquilibriert. Nun werden die sedimentierten Bakterien in 10 ml der Lösung E1 aus dem Kit resuspendiert

und dann 10 ml Lösung E2 zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 10 ml Lösung E3 zugegeben, wodurch die Lösung neutralisiert wird und die Proteine ausfallen. Die ausgefallenen Proteine werden abgetrennt, indem man die Lösung durch einen Faltenfilter gibt. Die gefilterte Lösung wird nun auf die Säule gegeben. Nachdem die Lösung durchgelaufen ist und dabei die Plasmide an die Säule gebunden haben, wird diese mit 60 ml Lösung E5 gewaschen. Schließlich wird die Plasmid-DNA mit 15 ml Lösung E6 wieder aus der Säule eluiert. Nun werden jeweils 800 µl dieser Lösung auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt, durch Zugabe von je 700 µl Isopropanol und Inkubation bei -70°C für 5 min die DNA gefällt und durch 15 min Zentrifugation bei $20.000 \times g$ und 4°C sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 70 %igem Ethanol und anschließendem Trocknen wird die DNA in jeweils 10 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und dann gepoolt. Die Ausbeute bei dieser Methode liegt bei 100-300 µg Plasmid-DNA.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden erfolgt photometrisch im Spektralphotometer unter Verwendung von Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke. Dazu wird bei Wellenlängen von 260 und 320 nm die Extinktion ermittelt, wobei man gegen eine Referenzküvette abgleicht, die nur den Puffer enthält, in dem die Nukleinsäure gelöst ist. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während die zweite Messung bei 320 nm einer Abschätzung der Sauberkeit der Präparation dient, da bei dieser Wellenlänge Verunreinigungen mit Salzen ermittelt werden können.

Somit kann mit der nachfolgenden Formel die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung rechnerisch ermittelt werden:

$$c = (E_{260} - E_{320}) \cdot f \cdot K$$

c = Konzentration

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

K = Faktor; die Konzentration, die in 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm 1 OD entspricht.

Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von
50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsDNA
40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ssDNA
40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA.

3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an sequenzspezifischen Erkennungsstellen. Die Spaltung genomischer DNA für einen Southernblot erfolgte in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 μl , das sich aus 20 μg DNA, 2 μl des geeigneten Restriktionspuffers (wird vom Hersteller in einer 10fachen Konzentration mitgeliefert), 20 Einheiten (Units) des jeweiligen Restriktionsenzym und bidestilliertem Wasser zusammensetzt. Eine Unit eines Restriktionsenzym ist definiert als die Menge eines Enzyms, die ausreicht um in einer Stunde 1 μg DNA vollständig in die Restriktionsfragmente zu zerlegen. Das Volumen des eingesetzten Enzyms soll in einem Reaktionsansatz ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Die für die Reaktion optimale Temperatur und Zeit variieren je nach Enzym.

Zur Überprüfung von klonierter, rekombinanter DNA genügen in der Regel weniger als 1 μg DNA für einen Restriktionsverdau.

3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Ein Gemisch von DNA-Molekülen lässt sich aufgrund ihrer Größenunterschiede durch Elektrophorese trennen. Die Porengröße des verwendeten Gels bestimmt dabei die Geschwindigkeit, mit der sich die Moleküle im elektrischen Feld bewegen können. So werden Nukleinsäuren, die einen identischen

Ladungs/Masse-Quotienten aufweisen, in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge getrennt, da größere Moleküle langsamer durch die Gelporen wandern als kleine.

Um die Nukleinsäuren im Agarosegel sichtbar zu machen, werden sie mit Ethidiumbromid angefärbt, das zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht weiß-orange fluoresziert. Hierzu wird den Agarose-Gelen das Ethidiumbromid beim Gießen in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt.

Nach der elektrophoretischen Trennung der Nukleinsäuren und der dabei erfolgten Ethidiumbromidfärbung werden die Gele auf einem UV-Transilluminator mittels einer Polaroidkamera dokumentiert.

3.3.1 Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von DNA werden je nach benötigter Probenmenge oder Auftrennlänge verschiedene horizontale Systeme benutzt, die sich in dem Taschenvolumen und der Gelgröße unterscheiden. Bei PCR-Produkten und Plasmid-Restriktionsspaltungen werden 0,8 bis 1,2 %ige Agarosegele mit TBE-Puffer verwendet. Die angelegte Spannung variiert bei diesen Gelen zwischen 60 und 120 V. Zum Auftragen der Proben auf das Gel werden diese mit $\frac{1}{6}$ des Volumens Auftrag-Puffer versetzt. Um genomische DNA zu trennen, die mit Restriktionsenzymen verdaut wurde, werden 0,8 %ige Agarosegele mit Tris-Phosphat-Puffer verwendet. Diese Gele laufen zur besseren Auftrennung bei einer Spannung von 50 V über Nacht.

3.3.2 Auftrennung von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgt in vertikalen, formaldehydhaltigen Agarose-Gelen unter denaturierenden Bedingungen. Dabei werden 0,6 g Agarose in 30 ml 1 x Mops-Puffer durch Aufkochen gelöst und zum Abdichten der Gelkammer als Sockelgel gegossen. Für das Trenngel werden 1,5 g Agarose in 22,5 ml 5 x Mops-Puffer und 90 ml bidestilliertem

Wasser aufgekocht, mit 10 ml Formaldehyd und 5 μ l Ethidiumbromid versetzt und von oben in die Gelkammer gegossen. Dann wird der Kamm eingesetzt, um die Taschen für das spätere Beladen des Gels zu erhalten. Nach dem Erkalten wird das Gel für mindestens 10 Minuten zum vollständigen Erstarren in den Kühlschrank gestellt.

Zur Probenaufbereitung werden 20 μ g RNA eingesetzt und 7 μ l Formaldehyd sowie 4 μ l 5 x Mops-Puffer hinzupipettiert. Dieser Ansatz wird zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen für 5 bis 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur werden 4 μ l RNA-Auftragpuffer hinzupipettiert. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgt für 10 min bei 65 V und die Auftrennung der RNA bei 90 V für etwa 2 h.

3.4 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose

Die Nukleinsäuren werden aus einem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, so dass ein präzises Abbild der im Gel getrennten Moleküle entsteht. Zu diesem Zweck wird ein Kapillarblot derart aufgebaut, dass von unten aus einem Vorratsgefäß 20 x SSC-Puffer durch die Kapillarkräfte nach oben durch das Gel und die Membran in die Gel-Blotting-Papiere und einen Papierhandtuchstapel gezogen wird. Dabei bleiben die Nukleinsäuren auf der Membran hängen und können dort fixiert werden.

3.4.1 Transfer von DNA – Southernblot (SOUTHERN, 1975)

Nachdem die Elektrophorese beendet ist, werden das Gel zurechtgeschnitten, die Längenstandards markiert und der Lauf der DNA fotografisch dokumentiert. Nun wird das Gel für 20 min in 250 mM HCl inkubiert, um die DNA zu depurinieren. Anschließend erfolgt für 25 min die Denaturierung in der Denaturierungslösung und schließlich die Neutralisierung in Neutralisierungslösung für mindestens 30 min. Als Transferpuffer wird 20 x SSC verwendet. Über eine Glasplatte, die auf dem Transferpuffergefäß liegt, wird ein mit 20 x

SSC befeuchtetes Gel-Blotting-Papier so plaziert, daß beide Enden gleichmäßig in das Reservoir eintauchen und eine Brücke bilden. Das vorbereitete Gel wird luftblasenfrei aufgelegt. Nicht bedeckte Teile der Brücke werden mit Haushaltsfolie abgedichtet, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel erfolgt. Darauf werden nacheinander eine in bidestilliertem Wasser getränkte Nitrocellulose-Membran und drei ebenfalls in bidestilliertem Wasser befeuchtete Gel-Blotting-Papiere luftblasenfrei aufgelegt. Ein Stapel Papierhandtücher wird zur Erhöhung der Kapillarkraft auf die Gel-Blotting-Papiere gelegt und mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgt während einer Zeitspanne von mindestens 12 h. Bei Abbau des Blotsystems werden die Markierungen des Längenstandards sowie die Geltaschen auf der Membran eingezeichnet. Die Nitrocellulose-Membran wird zur Entfernung der Agarosereste kurz in 2 x SSC abgespült, dann luftgetrocknet und anschließend für zwei Stunden bei 80°C gebacken, um die Nukleinsäuren zu fixieren.

3.4.2 Transfer von RNA – Northernblot (ALWINE et al., 1977)

Die Übertragung von RNA auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgt im Wesentlichen wie schon in Abschnitt 3.4.1 für den Southernblot beschrieben wurde. Allerdings müssen die RNA-Gele nicht vorbehandelt werden, da die RNA bereits einsträngig vorliegt. Der Abbau des Blots und die Fixierung der RNA erfolgen analog zum Southernblot.

3.5 Radioaktive Markierung von DNA durch Random-prime-Reaktion (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Gebrauch von Nonanukleotid-Zufallssequenzen, die sich an verschiedenen Stellen der als Sonde vorgesehenen denaturierten *template*-DNA anlagern und dadurch die DNA-Synthese initiieren. Der Primer-*template*-Komplex stellt das Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I dar. Die radioaktive Markierung erfolgt

durch den Einbau von radioaktiv markiertem dCTP in die neusynthetisierte DNA.

Für einen normalen Ansatz werden 50-100 ng *template*-DNA in 30 µl bidestilliertem Wasser mit 5 µl Primer-Lösung versetzt und 2-5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend lässt man das Gemisch langsam auf Raumtemperatur abkühlen, damit sich die Primer anlagern können. Dann werden 10 µl Labelling-Puffer, 3 µl [α -³²P] dCTP (entspricht 30 µCi) und 2 U Klenow-Polymerase hinzupipettiert und 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die Primer-Lösung sowie Labelling-Puffer und Klenow-Polymerase sind in dem Megaprime DNA Labelling System der Firma Amersham Biosciences GmbH enthalten.

3.6 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Die Membran, auf die die Nukleinsäuren übertragen wurden (siehe 3.4), wird vor der Hybridisierung in 2 x SSC gelegt, bis sie vollständig durchfeuchtet ist und dann möglichst luftblasenfrei an die Innenseite eines Hybridisierungsrollers platziert, wobei die Nukleinsäureseite zum Innern des Rollers gerichtet ist. Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der spezifischen Sonde erfolgt zunächst eine Prähybridisierung, die dazu dient, alle unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu besetzen, damit sich an diesen Stellen später keine radioaktiv markierte Sonde unspezifisch anlagert. Für die Prähybridisierung werden 10 ml auf 65°C erwärmte Hybridisierungslösung in den Roller gefüllt und dann 600 µl für 5 min bei 100 °C denaturierte Heringsspermien-DNA hinzugegeben. Nach dem Verschließen des Rollers erfolgt diese Prähybridisierung im Rollerschrank für mindestens zwei h bei 60°C und 10 rpm.

Für die eigentliche Hybridisierung wird die radioaktiv markierte Probe zunächst für 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert und dann zu der Prähybridisierungslösung in den Roller pipettiert. Die Hybridisierung läuft über Nacht bei der gleichen Temperatur wie die Prähybridisierung ab.

Am nächsten Tag wird die Membran aus dem Roller genommen und in mehreren Schritten gewaschen um unspezifisch an die Nukleinsäuren gebundene radioaktiv markierte DNA zu entfernen. Als Waschpuffer dient

zunächst 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei 60°C. Die Stringenz der Waschung kann durch Verringern der Salzkonzentration des Puffers (0,2 x SSC; 0,1 % SDS) und Steigerung der Waschtemperatur (68°C) erhöht werden und richtet sich nach Länge und Spezifität der Sonde.

3.7 Autoradiographie

Um die hybridisierten Membranen feucht zu halten, werden sie in Haushaltsfolie eingewickelt. Dann werden sie in eine Autoradiographiekassette mit je zwei Verstärkerfolien gelegt und bei Rotlicht in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Strahlungsintensität wird dieser für einige Stunden bis mehrere Tage bei -60°C exponiert.

Zum Entwickeln wird der Film in Entwicklerflüssigkeit getaucht, bis bei Rotlicht eine Schwärzung auf dem Röntgenfilm zu erkennen ist. Anschließend wird der Film in Fixiererlösung getaucht, bis er klar ist. Schließlich wird er etwa 5 min unter fließendem Wasser gespült und dann getrocknet.

3.8 Reverse Transkription (RT)

Als reverse Transkription bezeichnet man das „Umschreiben“ von RNA in cDNA unter Verwendung von Reverser Transkriptase. Dabei wird die Transkription entweder mit einem Oligo(dT)-Primer als Starter der Transkription durchgeführt, wodurch nur Poly(A)⁺mRNA revers transkribiert wird oder unter Verwendung von einem Gemisch von Nonanukleotid-Zufallssequenzen, die sich an jegliche RNA anlagern können. Ein normaler Reaktionsansatz für die reverse Transkription setzt sich wie folgt zusammen: Fünf µg totale RNA, 10 µl 5 x Erststrangpuffer (vom Hersteller mitgeliefert), 25 pmol Oligo(dT)-Primer, 1 µl 10 mM dNTP, 40 U RNasin zur Inhibition von RNasen, 200 U Reverse Transkriptase und bidestilliertes Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl. Vor der Zugabe der Transkriptase wird der Reaktionsansatz für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert, wodurch sich Sekundärstrukturen der RNA lösen. Danach wird das Enzym zur Reaktion pipettiert, und es folgt eine Inkubation von 1 h bei

42°C im Wasserbad. Nachdem die Reaktion beendet ist, wird die Reverse Transkriptase durch fünfminütige Inkubation bei 70°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Von diesem Reaktionsansatz setzt man 0,1-1 µl in einem nachfolgenden 50-µl-PCR-Ansatz ein.

3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt die Amplifikation einer spezifischen Sequenz ohne Klonierung, wobei zwei Primer das zu amplifizierende DNA-Fragment umfassen. Diese Primer binden jeweils an den unterschiedlichen DNA-Strängen, wobei die 3'-Enden der Primer zueinander zeigen. Durch die **Denaturierung** werden die beiden Stränge voneinander getrennt und so die Bindung der Primer an die homologe Sequenz ermöglicht (**Annealing**). Es schließt sich die **Elongation** an, bei der die jeweils komplementären Stränge vervollständigt werden. Die genannten drei Einzelschritte bilden einen Zyklus, der in der Regel 30 bis 40 mal wiederholt wird. Für diese Reaktion ist eine thermostabile DNA-Polymerase nötig, damit das zugesetzte Enzym während der Reaktion nicht denaturiert. Ein solch stabiles Enzym findet man in dem Bakterium *Thermus aquaticus*, dessen Temperaturoptimum bei 72°C liegt.

Eine PCR setzt sich in der Regel aus den folgenden Schritten zusammen, wobei Temperaturen und Zeiten variabel sind:

Denaturierung	94°C für 30 s,
Annealing	50-70°C für 30 s,
Elongation	72°C für 60 s (pro kb zu amplifizierende DNA)

Die für die Denaturierung notwendige Zeit hängt von der Art der eingesetzten *template*-DNA ab. Verwendet man klonale DNA, dann genügt eine Denaturierung von 30 s. Handelt es sich allerdings um genomische DNA, dann sollte für 45 s denaturiert werden. Es empfiehlt sich außerdem als einmaligen ersten Schritt eine zweiminütige Denaturierung, damit die *template*-DNA vollständig denaturiert wird.

Die Annealingtemperatur ergibt sich aus der Schmelztemperatur T_m der Primer nach folgender Formel:

$$(C+G) \cdot 4 + (A+T) \cdot 2 = T_m$$

Die Zeit für die Elongation richtet sich nach der Länge des erwarteten Amplifikats, wobei üblicherweise eine Minute pro 1.000 bp gerechnet wird.

Ein typischer Reaktionsansatz für eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l besteht aus 5 μ l 10 x PCR-Puffer, 1,5 μ l 50 mM $MgCl_2$, 1 μ l 10 mM dNTP, 25 pmol 5'-Primer, 25 pmol 3'-Primer, 50-500 ng DNA und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase.

Nach Ablauf der Reaktion werden in der Regel 20 μ l des Reaktionsansatzes zur Überprüfung des amplifizierten Produkts auf einem 0,8 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Soll das Amplifikat jedoch später aus dem Gel eluiert werden, wird der ganze Reaktionsansatz aufgetragen.

3.9.1 PCR-Protokolle

Tab. 3: Auflistung der Primerkombination, Annealingtemperatur und Elongationszeit für die durchgeführten PCR-Ansätze

<i>Primerpaarung</i>	<i>Annealingtemperatur</i>	<i>Elongationszeit</i>
MIC-5s und MIC-5t	57°C	1 min
MIC2-5e und MIC-18	57°C	1 min
MIC-5e und MIC-18	57°C	1 min
MIC 5' utr und MICA-2	56°C	1 min 30 s
MICSonde 5' und MICSonde 3'	56°C	1 min
MICSonde 1 und MICSonde 2	56°C	1 min
MIC 7 und MIC 16	55°C	1 min
MIC-Bakt5' und MIC-Bakt3'	55°C	1 min

3.10 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit JETSORB

Die zu eluierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und in ein Reagiergefäß überführt. Nun werden pro 100 mg Gelstück 300 μ l A1-

Puffer und 10 µl JETSORB Suspension gegeben. Die Suspension wird 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert und während dieser Zeit etwa alle 3 min geschüttelt, um das Absetzen der Glasmilch auf den Boden des Reagiergefäßes zu verhindern. Anschließend zentrifugiert man für 30 s bei mindestens 10.000 x g (Tischzentrifuge) und verwirft den Überstand. Das Sediment wird in A1-Puffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Nun wird das Sediment zweimal mit A2-Puffer gewaschen und wieder jeweils 30 s bei mindestens 10.000 x g abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird das Sediment für etwa 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 25 µl Wasser gelöst. Nach erneuter Inkubation bei 50°C im Wasserbad für 5 min und abschließendem Zentrifugieren enthält der Überstand die eluierte DNA.

3.11 Klonierung von PCR-Produkten

Der QIAGEN PCR Cloning Kit erlaubt es, einfach und schnell PCR-Produkte in einen Plasmid-Vektor zu klonieren. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, daß die *Taq*-DNA-Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten anhängt. Der in dem Cloning-Kit enthaltene pDRIVE-Vektor besitzt an seinen 3'-Enden wiederum überstehende Uracil-Überhänge, die eine effiziente Insertligation ermöglichen, da Uracil zu Adenosin komplementär ist. Für eine typische Ligation werden 1-4 µl frisches PCR-Produkt (oder Eluat), 1 µl pDRIVE Vektor (50 ng), 5 µl 2 x Ligationsmastermix und bidestilliertes Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl pipettiert. Die Reaktion wird 30 min bei 14°C im Wasserbad inkubiert und schließlich wird für 10 min bei 70°C die Ligase inaktiviert.

Für die Transformation werden kompetente *E. coli*-Bakterien (DH10B) benutzt. Die Bakterien werden auf Eis aufgetaut, mit 1-2µl des Ligationsansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Elektroschock von 1800 V für 3-5 ms, der es den zirkulären Plasmiden ermöglicht, in die Zellen zu gelangen. Nun werden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur pipettiert. Damit die Bakterien die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz exprimieren können, werden sie zunächst für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden auf einer Agarplatte 50 µl und auf einer zweiten 200 µl

der Bakteriensuspension ausgestrichen. Die Platten sind mit dem jeweiligen Antibiotikum behandelt, damit nur Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben, welches für die Resistenz kodiert. Im Fall des pDRIVE-Vektors wird durch eine erfolgreiche Insertion der Leserahmen der β -Galaktosidase unterbrochen, während er bei nichtrekombinanten Bakterien intakt bleibt. Nach Stimulation mit IPTG produzieren nicht rekombinante Bakterienzellen das Enzym β -Galaktosidase, welches das zunächst farblose X-Gal in einen blauen Farbstoff metabolisiert. Auf diese Weise kann man die nichtrekombinanten blauen Kolonien von den rekombinanten weißen unterscheiden.

Der für diese Arbeit ebenfalls verwendete pCR-3.1-Vektor besitzt nicht das für β -Galaktosidase kodierende Gen, so dass hier alle Kolonien weiß bleiben. In diesen Vektor wurden die Konstrukte über Restriktionsschnittstellen kloniert. Dazu wurden Vektor und Insert mit den entsprechenden Enzymen verdaut und über eine Gelelution von den Enzymen gereinigt. Ein typischer Ligationsansatz enthält in diesem Fall 1 μ l Vektor (50 ng), 1-6 μ l Insert, 1 μ l T4-DNA-Ligase (1 U), 1 μ l 10x Ligationspuffer und bidestilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 10 μ l. Die Inkubation erfolgt bei 14 °C im Wasserbad über Nacht. Vor der Transformation der Bakterien wird bei diesem Ansatz die Plasmid-DNA zunächst präzipitiert und dann in 10 μ l bidestilliertem Wasser aufgenommen.

3.12 Nichtradioaktive Sequenzierung von doppelsträngiger DNA (SANGER et al., 1977)

Die klassische DNA-Sequenzierung beruht auf der Synthese eines neuen DNA-Stranges, die an einem spezifischen Primer beginnt und mit dem Einbau eines 2',3'-Dideoxynalogon von Nukleotidtriphosphaten endet, so dass man von „Kettenabbruchmethode“ spricht (SANGER et al., 1977).

Wie bei einer normalen PCR synthetisiert die DNA-Polymerase, die bei dieser Reaktion verwendet wird, anhand der Vorlage eines DNA-Stranges (*template*-

DNA) einen basenkomplementären Gegenstrang. Da die *template*-DNA in Form von doppelsträngiger DNA vorliegt, muss diese in einem ersten Schritt denaturiert werden. Für den nachfolgenden Synthesestart benötigt die Polymerase einen Primer, der mit dem *template* ein Hybrid bildet und somit als Startermolekül für die Polymerase fungiert (Annealing). Der Gegenstrang wird durch den Einbau komplementärer Basen in Form von dNTP synthetisiert (Elongation). In dem Reaktionsansatz sind allerdings nicht nur dNTP sondern auch ddNTP in einem definierten Verhältnis enthalten. Wird ein ddNTP eingebaut, bricht die Kettenverlängerung ab, da dem ddNTP die 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, um eine Phosphodiesterbindung einzugehen (Kettenabbruch). Dadurch entsteht ein Gemisch aus DNA-Molekülen, die alle mit dem eingesetzten Primer beginnen, aber verschieden lang sind und mit einem der vier ddNTP enden.

Der *Cycle-Sequenzierung* liegt die Methode von SANGER et al. (1977) zugrunde. Im Gegensatz zur klassischen Sequenzierung, die die Schritte Denaturierung, Annealing und Kettenverlängerung nur einmal pro Ansatz durchläuft, werden hier die notwendigen Kopien durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus (20-30 mal) erreicht. Da die vier verschiedenen ddNTP bei dieser Methode mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Reaktion in einem einzigen Ansatz ablaufen. Die Denaturierung erfolgt durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94°C. Aus diesem Grund kann nur eine thermostabile Polymerase zur Cycle-Sequenzierung eingesetzt werden.

Die Sequenzierung von dsDNA wurde mit dem Genetic Analyzer der Firma PE Applied Biosystems, Modell 310, durchgeführt. Entsprechend der Herstellerangabe wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit eingesetzt. Der Terminator Ready Reaction Mix enthält neben den mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTP MgCl₂, dNTP und AmpliTaq DNA-Polymerase gemischt mit thermostabiler Pyrophosphatase in Tris/HCl-Puffer (pH 9,0). Die bei der Reaktion entstehenden PCR-Fragmente sind am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markiert und werden im Genetic Analyzer in einer Glaskapillare aufgetrennt. Werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laserstrahlung angeregt, so emittieren sie Licht einer für jeden Farbstoff spezifischen Wellenlänge, welches von einem Detektor aufgefangen, digital verarbeitet und analysiert wird.

Für einen Reaktionsansatz werden 0,5-1,0 µg DNA, 10 pmol Primer, 3 µl Termination-Mix und bidestilliertes Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Reaktion wird im Thermocycler nach dem folgenden Programm durchgeführt, wobei diese Abfolge 24 mal wiederholt wird:

Denaturierung für 30 s bei 94°C,

Annealing für 15 s bei 50°C,

Elongation für 4 min bei 60°C.

Nach Beendigung der Reaktion wird der Reaktionsansatz auf 50 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M NaAc (pH 5,5) und 2,5 Volumina 100 % Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt und 20 min bei 20.000 x g (Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wird mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl HPLC-Wasser aufgenommen. Die Proben sind somit fertig zum Laden des ABI 310 Genetic Analyzers. Ein Erhitzen zur Trennung der DNA-Doppelstränge ist nicht nötig, da das Trenngel des ABI 310 denaturierend wirkt.

3.13 Zellkulturmethoden

3.13.1 Allgemeines Arbeiten

Einer der wichtigsten Aspekte bei der Arbeit mit Zellkulturen ist die Vermeidung von Kontaminationen durch Pilze oder Bakterien. Aus diesem Grund werden in der Regel alle Arbeiten mit den Zellen an einer sterilen Werkbank durchgeführt, die nach dem Prinzip des laminaren Luftstroms arbeitet. Alle Arbeitsmaterialien mit Ausnahme von einzeln steril verpackten Einwegartikeln werden in einem Autoklaven sterilisiert. Glas- und Metallgegenstände werden 10 min bei 134°C und 2,2 bar autoklaviert, Plastikartikel für 20 min bei 120°C und 1,1 bar. Zusätzlich werden Deckel, Glaspipetten etc. vor dem Gebrauch noch kurz abgeflammt. Meist wird mit Glaspipetten und einer automatischen Pipettierhilfe pipettiert, seltener mit Pasteurpipetten oder Mikroliterpipetten und autoklavierten Pipettenspitzen.

3.13.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Kultur von eukaryotischen Zellen finden zwei unterschiedliche Kulturmedien Verwendung. Das eine wird E⁺⁺-Medium genannt, und es handelt sich dabei um DMEM-Medium, das mit NaHCO₃ gepuffert ist. Dieses Medium hat einen pH von 7,0 und ihm wird 10 % FCS, sowie Pyruvat, Penicillin und Streptomycin zugesetzt. In diesem Medium werden die Zellen in den Brutschränken kultiviert, in denen die Luft 10 % CO₂ enthält. Für Wasch- und Inkubationsschritte außerhalb der Brutschranke wird das sogenannte E+H-Medium verwendet. Dabei handelt es sich ebenfalls um DMEM-Medium, das jedoch mit HEPES gepuffert ist (pH 7,2). Diesem Medium wird nur bei längeren Inkubationszeiten der Zellen FCS zugesetzt.

3.13.3 Gewinnung von Lymphozyten aus peripherem Blut

3.13.3.1 Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

Eine Methode zur Gewinnung von mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) aus peripherem Blut ist die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Dabei werden die im Blut enthaltenen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch eine Zentrifugation über die Ficoll-Hypaque-Lösung (1,077 g/cm²) getrennt.

Dazu wird das Blut zunächst mit der gleichen Menge E+H-Medium verdünnt. Nun wird in 13-ml-Röhrchen jeweils 4 ml Ficoll-Hypaque vorgelegt und dann vorsichtig mit 6 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Nachdem die Röhrchen 20 min bei 600 x g zentrifugiert wurden, haben sich vier Schichten gebildet. Das Sediment enthält die Erythrozyten und Granulozyten, darüber das Ficoll, gefolgt von einer dünnen Schicht in der sich die Lymphozyten und Monozyten befinden und schließlich das E+H-Medium. Nun nimmt man vorsichtig mit einer Pasteurpipette die Schicht mit den Lymphozyten ab und überführt sie in ein neues Röhrchen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 600 x g werden die Lymphozyten sedimentiert und können von dem restlichen E+H-Medium getrennt werden.

3.13.3.2 Erythrozytenlyse

Eine weitere Methode, die kernhaltigen Zellen aus peripherem Blut zu isolieren, ist die Lyse der Erythrozyten. Dazu wird das Blut auf die zehnfache Menge mit Erythrozytenlysepuffer aufgefüllt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten lässt sich dabei auch optisch überprüfen, da das Gemisch von einem trüben, undurchsichtigen Rot zu einem klaren durchscheinenden Rot wechselt. Anschließend werden die kernhaltigen Zellen für 10 min bei 300 x g abzentrifugiert und ein- bis zweimal mit PBS gewaschen, um die Reste des Lysepuffers zu entfernen.

3.13.4 Herstellung von Concanavalin A-Überstand (ConA-Überstand)

Zur Herstellung des vor allem IL-2 enthaltenden ConA-Überstands wird zunächst eine Rattenmilz in 10 ml E+H-Medium steril homogenisiert. Dann werden die Zellen durch Zentrifugieren bei 300 x g für 10 min pelletiert und nach Abgießen des E+H-Mediums in 40 ml E⁺⁺-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 5 µg/ml ConA werden die Zellen 4 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann werden sie erneut für 10 min bei 300 x g zentrifugiert, in 20 ml E⁺⁺-Medium resuspendiert und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Zur Gewinnung des Überstandes wird die Zellsuspension schließlich für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.13.5 Aktivierung von Killerzellen mit ConA-Überstand (LAK-Zellen)

Um die Aktivität von NK-Zellen zu erhöhen, können diese durch einen IL-2 enthaltenden ConA-Überstand stimuliert werden. Man nennt sie dann Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen). Hierzu werden jeweils etwa 2-3 x 10⁶ durch Ficoll-Trennung aus dem peripheren Blut gewonnene Lymphozyten in 8 ml E⁺⁺-Medium und 2 ml Con-A-Überstand aufgenommen und in einer Petrischale ausgesät. Nach 4-5 Tagen haben die LAK-Zellen die stärkste Aktivität erreicht und können in einem Chromfreisetzungstest eingesetzt werden.

3.13.6 Kultivierung von Sertoli-Zellen

Um die Sertoli-Zellen aus dem Testis zu isolieren und zu kultivieren, werden zunächst die Testes präpariert und in E+H Medium überführt. Nun wird auf einer Petrischale die Kapsel entfernt, das Gewebe grob zerkleinert und in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 5 ml E+H Medium mit 1 mg/ml Collagenase wird im Wasserbad für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wird das Röhrchen mit E+H Medium auf 50 ml aufgefüllt. Nachdem sich die Zellen nach etwa 5 min abgesetzt haben, wird der Überstand verworfen und der Waschschrift wiederholt. Nun werden die Zellen in E⁺⁺-Medium aufgenommen und auf einer beschichteten Petrischale ausgesät. Nach etwa zwei Tagen bilden die Sertoli-Zellen einen Monolayer am Boden der Schale, während die Keimzellen im Überstand schwimmen und durch den Wechsel des Kulturmediums entfernt werden können.

3.13.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion wurde die L-Zelllinie der Maus verwendet, da im Mausgenom bisher keine MIC-Gene nachgewiesen werden konnten. Bei der Transfektion wurden ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen mit 30 µg Plasmid-DNA des Rhesusaffen-Cosmid-Klons A158 (MIC3) zusammen mit 1 µg des dSRed-Vektors für 1,5 ms mit 350 V elektroporiert. Der dSRed-Vektor vermittelt in dieser Ko-Transfektion den transfizierten Zellen dabei eine Neomycin-Resistenz, da der Cosmid-Vektor selbst kein Resistenzgen für eukaryotische Zellen trägt. Für die Elektroporation werden die Zellen in 500 µl E+H-Medium mit 1% FCS aufgenommen und die DNA dazu pipettiert. Anschließend werden die Zellen in einer Küvette einem Stromimpuls von 350 V für 1,5 ms ausgesetzt. Schließlich werden die Zellen in beschichteten Petrischalen mit E⁺⁺-Medium kultiviert.

3.13.8 Selektion transfizierter Zellen

Dem Kulturmedium wird 48 h nach der Transfektion 1 mg/ml Geneticin zugegeben. Alle Zellen, die nicht die durch den dSRed-Vektor vermittelte

Geneticinresistenz besitzen, sterben daraufhin innerhalb von einer Woche ab. Da die Cosmid DNA bei der Elektroporation im deutlichen Überschuß zugegeben wurde, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß die Zellen die das Plasmid mit der Resistenz besitzen auch das Cosmid enthalten. Nach einigen Tagen haben sich aus den vereinzelt überlebenden Zellen kleine Kolonien entwickelt, die man mit einer Pipette aufnehmen und auf 24-Well-Platten überführen kann.

3.13.9 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren werden die Zellen in E+H Medium mit 10 % FCS aufgenommen, und dann wird 10 % DMSO zugesetzt. Nach dem Überführen in spezielle 1,8-ml-Röhrchen (CryoTube Vials, Nunc) werden die Zellen langsam eingefroren. Dazu deponiert man sie in einer Styroporbox und diese dann in einen -80°C Gefrierschrank. Dadurch sinkt die Temperatur um etwa ein Grad pro Minute. Zur dauerhaften Konservierung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.14 Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie können einzelne Zellen auf ihre Expression bestimmter Proteine hin untersucht werden. Dabei werden entweder polyklonale oder monoklonale Antikörper verwendet, die gegen das zu untersuchende Protein (Antigen) gerichtet sind. Diese Antikörper können entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sein wie z.B. Fluorescein (FITC), oder indirekt über einen zweiten, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, nachgewiesen werden. Dabei werden dann die Zellen nacheinander für 30-60 min bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Anschließend werden nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Zellen mit PBS entfernt.

In dem Durchflußzytometer werden die Zellen dann durch eine Hohnadel gesaugt und in eine Kapillare gedrückt. Dabei entsteht ein Strahl feiner

Tröpfchen, von denen jedes nur eine Zelle enthält. Die Zellen passieren dabei einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei kommt es zu einer Lichtstreuung an den Zellen. Das auf diese Weise gestreute Licht wird dann von Photodetektoren gemessen. Dabei wird das von den Zellen absorbierte Licht im sogenannten *forward scatter* gemessen und gibt Aufschluss über die Größe der Zellen. Das um 90° abgelenkte Licht wird hingegen im *side scatter* gemessen und ist ein Maß für die Granulierung der Zellen. Bereits anhand dieser zwei Parameter kann man unterschiedliche Zellpopulationen unterscheiden, wie etwa Lymphozyten und Monozyten. Durch das Setzen von sogenannten *gates* auf die bestimmte Zellpopulationen kann die Fluoreszenzauswertung auf diese beschränkt werden.

Für die Fluoreszenzauswertung werden die Zellen vor der Messung mit Antikörpern inkubiert, die mit Farbstoffmolekülen konjugiert sind. Sind bei der Messung solche Antikörper an die Zellen gebunden, werden die an die Antikörper gebundenen Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt. Das von den gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird parallel in weiteren Kanälen gemessen, wobei die Intensität ein Maß für die Bindung der Antikörper an die Zelle ist und somit auch für die Expression des untersuchten Proteins. Für die Auswertung kann in einem Histogramm die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen werden. Wurden mehrere Farbstoffe verwendet, die Licht von unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, können ihre Fluoreszenzintensitäten in Dot-plot-Diagrammen gegeneinander aufgetragen werden.

3.15 Chromfreisetzungstest

Bei dieser Methode wird die Lysierbarkeit bestimmter Zielzellen durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) über die Menge an freigesetztem radioaktiven ^{51}Cr bestimmt.

Dazu werden zunächst 1×10^6 Zielzellen radioaktiv markiert, indem sie für eine Stunde bei 37°C in einem unbegasteten Brutschrank mit einer Chromierungslösung inkubiert werden. Diese besteht aus E+H Medium mit 40

% FCS und 50 $\mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung. Anschließend wird nicht eingebautes ^{51}Cr durch dreimaliges Waschen mit E+H-Medium entfernt.

Für den Test werden in einer Rundboden-Mikrotiterplatte die Effektorzellen in einer geometrischen Verdünnungsreihe von 1×10^6 bis $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in 100 μl E+H (10 % FCS) vorgelegt. Dabei bleibt die letzte Reihe der Platte frei um später das von den Zielzellen spontan freigesetzte ^{51}Cr bestimmen zu können (Spontanrelease). Dann werden in alle Wells 1×10^4 ^{51}Cr -markierte Zielzellen in 100 μl E+H (10 % FCS) hinzupipettiert und die Platte für 5 min bei 40 x g anzentrifugiert, um für die gesamte Dauer des Tests die räumliche Nähe von Effektor- und Zielzellen zu gewährleisten. Nach einer Inkubation bei 37°C für 4 h wird die Platte erneut 5 min bei 40 x g zentrifugiert und vorsichtig 50 μl Überstand abgenommen und in eine 96-Well-Messplatte pipettiert. Zur späteren Bestimmung der Gesamtmenge an aufgenommenem ^{51}Cr in die Zielzellen wird nun je 5 μl einer 1 %igen NP40-Lösung in die Wells der Testplatte gegeben, um die sedimentierten Zellen zu lysieren und das ^{51}Cr freizusetzen. Nach mehrmaligem Durchmischen wird erneut 50 μl dieses Zelllysats (Sediment) auf eine weitere 96-Well-Messplatte pipettiert. Um die im Überstand und Sediment enthaltene Aktivität messen zu können, werden nun die Wells der Messplatten mit 200 μl Szintillator aufgefüllt und nach Verschließen der Platte mit einer Klebefolie auf einem Schüttler bei 1000 rpm für 5 min gemischt. Durch den Szintillator wird nun die bei den radioaktiven Zerfällen freiwerdende Energie als Lichtblitze „sichtbar“ gemacht und kann im Wallac Micro Beta Counter als counts per minute (cpm) gemessen werden. Aus den auf diese Weise erhaltenen Werten für die Aktivität in Überstand (Ü) und Sediment (S) lässt sich schließlich die spezifische Lyse der Zielzellen nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Spez. Lyse [\%]} = \left(\frac{4 \times \text{Ü [cpm]} \times 100}{(3 \times \text{S [cpm]} + \text{Ü [cpm]})} \right) - \left(\frac{4 \times \text{Ü [cpm]} \times 100}{(3 \times \text{S [cpm]} + \text{Ü [cpm]})} \right)_{\text{Killing Spontanrelease}}$$

3.16 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Die zu lysierenden Zellen werden geerntet und einmal mit PBS gewaschen, um die Reste des Kulturmediums und des darin enthaltenen FCS zu entfernen. Nach dem Zählen der Zellen werden sie durch Zentrifugation bei 300 x g für 10 min pelletiert und das PBS vollständig abgenommen. Nun werden pro 2×10^5 Zellen 20 μ l SDS-Probenpuffer zugegeben und die Zellen durch Vortexen darin resuspendiert. Nach 5 bis 10 min Aufkochen der Suspension bei 100°C werden die Proben für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert und dann 20 μ l des Lysats auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.17 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (LAEMMLI, 1970)

Bei dieser Methode zur Trennung verschiedener Proteine in einem Polyacrylamidgel in Anwesenheit von SDS werden die Proteine durch das Detergenz denaturiert, da fast alle im nativen Protein vorhandenen nichtkovalenten Bindungen zerstört werden. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken gibt man zusätzlich β -Mercaptoethanol zu. An die Peptidketten lagern sich dann die SDS-Anionen an und verleihen dem so entstandenen Komplex eine negative Ladung, die ungefähr proportional zur Masse des Proteins ist. Die auf diese Weise erzeugte negative Ladung ist wesentlich größer als die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins, die somit vernachlässigt werden kann.

Für das Trenngel wird Polyacrylamid verwendet, weil es chemisch inert ist und durch Auspolymerisieren leicht herzustellen ist. Die Porengröße richtet sich nach dem Verhältnis von Acrylamid zu Methylenbisacrylamid, einem quervernetzenden Reagenz.

Zur Herstellung des Trenngels (10 %ig) werden 5 ml Acrylamid-Lösung (40 %), 5 ml Trenngelpuffer, 9,8 ml H₂O, 200 μ l APS (10 %) und 20 μ l TEMED gut gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter voneinander getrennt sind, und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das Isopropanol entfernt und auf das Trenngel ein 4

%iges Sammelgel gegossen. Dieses besteht aus 1 ml Acrylamid-Lösung (40 %), 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6,4 ml H₂O, 90 µl APS (10 %) und 10 µl TEMED. In das Sammelgel wird sofort nach dem Gießen der Kamm zur Bildung von Geltaschen gesteckt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren wird das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gestellt, und die Pufferreservoirs an den Enden des Gels werden mit Laufpuffer gefüllt. Nach dem Entfernen des Kamms können die Proben mit einer Hamiltonspritze in die Taschen geladen werden. Bis zum Erreichen des Trenngels lässt man die Proben bei 20 mA einlaufen und trennt sie dann bei 40 mA. Sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet.

3.18 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose – Westernblot (TOWBIN et al., 1979)

Diese Methode dient dazu, geringe Mengen eines bestimmten Proteins in einem Proteinlysate zu identifizieren. Dazu werden die durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo sie fest gebunden bleiben. Auf diese Weise sind sie für spezifische Antikörper zugänglich und können durch einen enzymmarkierten Sekundärantikörper in einer Substratreaktion sichtbar gemacht werden.

Für den Westernblot wird das Gel nach der SDS-Gelelektrophorese zunächst in Blotpuffer äquilibriert, und währenddessen werden zwei Blottingpapiere und die Nitrocellulose auf die richtige Größe zugeschnitten. Dann werden auf einer gelochten Plexiglasscheibe nacheinander ein Schwamm, ein Blottingpapier, das Gel, die Nitrocellulose, wieder ein Blottingpapier, ein Schwamm und eine weitere gelochte Plexiglasscheibe gelegt. Wichtig ist, dass alle Lagen zuvor mit Blotpuffer befeuchtet werden und die Nitrocellulose luftblasenfrei auf dem Gel aufliegt. Dieser Aufbau wird dann vertikal in die vorgekühlte Blotkammer eingesetzt. Der elektrische Transfer der Proteine erfolgt über Nacht bei 4°C und 100 mA. Nach dem Abbau des Blots wird die Nitrocellulose für einige Minuten in PBS/Tween gewaschen. Dann wird die Effizienz des Transfers überprüft, indem die Membran einige Minuten in Ponceau-S-Lösung (1:10 in PBS verdünnt)

inkubiert wird. Dadurch erscheinen die Proteine als rote Banden und die Banden des Molekulargewichtstandards können markiert werden. Durch Waschen mit PBS/Tween kann die Nitrocellulose wieder entfärbt werden.

3.19 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper

Um bestimmte Proteine durch einen spezifischen Antikörper nachweisen zu können, müssen zunächst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulose blockiert werden. Dazu wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS/Tween inkubiert. Dann wird der Primärantikörper in PBS/Tween verdünnt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur damit inkubiert. Anschließend wird dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen und wieder eine Stunde mit dem entsprechend verdünnten, enzymgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Vor Beginn der Substratreaktion wird erneut dreimal für 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Bei der Substratreaktion wird das auf der Membran gebundene Antigen kolorimetrisch detektiert. Dabei katalysiert das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase die Reaktion von DAB zu oxidiertem DAB mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel. Dazu löst man 25 mg DAB in 50 ml PBS/Tween und gibt 50 μ l H_2O_2 hinzu. Bereits nach einer Minute erfolgt eine deutliche Braunfärbung der positiven Proteinbanden. Die Reaktion wird durch Waschen der Membran in PBS/Tween gestoppt.

3.20 Erzeugung von MIC-transgenen Mäusen durch Pronukleusinjektion

Für die Herstellung transgener Mäuse wurden Cosmid-Klone (H17173 und A158, SEO et al 2001) verwendet, die das MIC2- bzw. MIC3-Gen des Rhesusaffen tragen.

Zunächst wurde die Cosmid-DNA unter Verwendung des JETSTAR Plasmid Maxi Kit (Genomed GmbH) aus je 100 ml Bakteriensuspension gewonnen (siehe 3.1.4). Anschließend wurde die Plasmid-DNA in einem

Restriktionsverdau mit dem Enzym Not I linearisiert (siehe 3.2) und durch eine Phenol-Chloroform-Reinigung von Verunreinigungen befreit.

Die Pronukleusinjektion und der Embryotransfer zur Erzeugung der transgenen Mäuse (FVB-Stamm) wurde vom Leiter des Tierhauses des MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen, Herrn Dr. Hermann Riedesel, durchgeführt.

Bei dieser Methode, die zuerst von GORDON et al. (1980) beschrieben wurde, wird das Transgen durch Mikroinjektion in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten Eizelle injiziert. Die so behandelten Eizellen werden dann in Ammenmütter überführt. Etwa drei Wochen nach der Geburt werden die Nachkommen auf die Anwesenheit des Transgens überprüft. Dazu wird DNA aus einer Schwanzbiopsie gewonnen und in einer PCR mit spezifischen Primern getestet. Die auf diese Weise identifizierten Tiere sind sogenannte Chimären, die das Transgen noch nicht in allen Körperzellen tragen. Um diejenigen zu identifizieren, bei denen das Transgen in den Keimzellen vorhanden ist, werden sie mit Wildtyp-Mäusen (FVB-Stamm) verpaart und die Nachkommen erneut genotypisiert. Die so identifizierten transgenen Tiere sind hemizygot und tragen das Transgen in allen Körperzellen.

3.21 Herstellung von Antiseren gegen das MIC3-Molekül

Im Vertebratenorganismus zeigt sich eine Immunantwort gegen eine körperfremde Substanz (Antigen) u.a. durch die Bildung von Antikörpern gegen das Antigen. Diese Antikörper werden von einer bestimmten Klasse von Lymphozyten, den B-Lymphozyten, produziert. Die Antikörper, die nach der Antigenexposition (Immunisation) gebildet werden, finden sich unter anderem auch im Blut und somit auch im daraus gewinnbaren Serum. Die Antikörper, die aus solch einem Serum gewonnen werden, sind polyklonal.

Um polyklonale Antikörper gegen Rhesus-MIC-Moleküle zu generieren, werden untransfizierte FVB-Mäuse mit MIC-exprimierenden Milz- und Thymuszellen von MIC3-transgenen FVB-Mäusen immunisiert. Am Tag vor der Immunisation wird von den Wildtypmäusen eine kleine Menge Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen und daraus Serum gewonnen. Mit diesem sogenannten

Nullserum wird überprüft, ob sich im Blut der Mäuse bereits vor der Immunisation Antikörper befinden, die mit der MIC3-transfizierten L-Zelllinie reagieren, die später zur Überprüfung der polyklonalen Antikörper dient.

Zur Gewinnung der MIC3-exprimierenden Milz- und Thymuszellen werden zunächst die MIC3-transgenen Tiere mit CO₂ getötet und dann nach Befeuchten des Fells mit 70 %igem Alkohol die Bauchhöhle geöffnet. Die Milz und der Thymus werden steril entnommen und in 10 ml E+H-Medium in einem 13-ml-Röhrchen überführt. Aus diesen Organen werden unter Verwendung eines Tenbroeck-Gewebehomogenisators Einzelzellsuspensionen gewonnen. Diese Zellen werden durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g pelletiert und zweimal mit E+H-Medium gewaschen.

Für die Immunisation werden die Milz- und Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus nach dem Waschen in 400 µl E+H-Medium resuspendiert und davon je 200 µl in eine FVB-Wildtypmaus intraperitoneal injiziert. Die Immunisation wird dreimal in Abständen von 10-14 Tagen wiederholt. Die Anwesenheit von Anti-MIC-Antikörpern wird überprüft, indem MIC3-exprimierende Zellen des MIC3-transfizierten L-Klons K43 und untransfizierte L-Zellen damit inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer analysiert werden.

3.22 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das MIC3-Molekül

In der Regel wird nach der Immunisation eine Vielzahl von Antikörpern gebildet, die unterschiedliche Affinität und Spezifität gegenüber dem Antigen aufweisen (=polyklonale Antikörper). Ein Antiserum ist also immer ein Gemisch verschiedener Antikörper. Außerdem ändert sich auch die Affinität und Spezifität der Immunantwort mit der Zeit nach der Immunisation oder nach wiederholter Antigenexposition. Dadurch lässt sich eine Immunantwort nie exakt reproduzieren.

Um diese Nachteile von polyklonalen Antikörpern zu umgehen, benutzt man monoklonale Antikörper, die in beliebiger Menge und von identischer Spezifität hergestellt werden können. Das Prinzip dieser von KÖHLER und MILSTEIN (1975) beschriebenen Methode ist die Fusionierung eines antikörperproduzierenden Lymphozyten mit einer Myelomzelle zu einer

Hybridomzelle. Auf diese Weise wird der ansonsten recht kurzlebigen antikörperbildenden Lymphozytenzelle die Fähigkeit der permanenten Proliferation von der Tumorzelle verliehen.

Die antikörperbildenden Lymphozyten stammen dabei von den FVB-Mäusen, die mit Milz- und Thymuszellen der MIC3-transgenen Mäuse immunisiert wurden und in deren Serum der gewünschte Antikörper nachgewiesen werden konnte. Am dritten Tag nach einer letzten Immunisation finden sich in der Milz dieser Tiere besonders viele Zellen, die den gesuchten Antikörper sezernieren und mit den Myelomzellen fusionieren können. Als Fusionspartner für die Lymphozyten werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (653) verwendet. Diese Zellen produzieren zum einen keine störenden eigenen Immunglobuline mehr. Zum anderen haben sie einen Defekt des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT), wodurch sie unfusioniert in HAT-Medium sterben.

Für die Fusion werden die Myelomzellen geerntet und mit E+H-Medium gewaschen. Die Milz des immunisierten Tieres wird mit einem Tenbroeck-Gewebehomogenisator homogenisiert und die Zellen einmal mit E+H-Medium gewaschen. Nun werden sowohl die Milz- als auch die Myelomzellen gezählt und dann in einem Verhältnis von 2 : 1 in ein 50-ml-Röhrchen gegeben. Pro 1×10^6 Milzzellen setzt man also 5×10^5 Myelomzellen ein. Die gemischten Zellen werden dann für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Dann wird das Zellpellet durch leichtes Klopfen gelöst. Nun erfolgt unter stetigem leichtem Schütteln die tropfenweise Zugabe von 1 ml PEG während 1 min. Nach 1 min Inkubation folgt ebenfalls tropfenweise die Zugabe von 1 ml E+H-Medium innerhalb von 1 min und weiter von 20 ml E+H-Medium innerhalb von 5 min. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei $300 \times g$ wird das Pellet schließlich in 1 ml HAT-Medium pro 1×10^6 Milzzellen aufgenommen und je 100 μ l/Well auf 96-Well-Platten verteilt. Die unfusionierten Zellen sterben nun innerhalb von 1-2 Wochen ab. Danach können die überlebenden Hybridomzellen auch in E⁺⁺-Medium gehalten werden. Nachdem sich die Hybridomzellen ausreichend vermehrt haben, wird getestet, ob die Hybridome den gewünschten MIC-Antikörper produzieren. Dazu werden je 1×10^6 Zellen

des MIC3 exprimierenden L-Klons K43 mit 50 µl Medium-Überstand inkubiert und nach einer weiteren Inkubation mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper im Durchflußzytometer gemessen.

3.23 Immunhistologie

3.23.1 Entparaffinierung von Paraffinschnitten

Um die Antigene für das Antiserum wieder zugänglich zu machen, müssen die Schnitte zunächst vom Paraffin befreit werden. Hierzu wird das Paraffin der Schnitte in einem Ofen bei 60 °C verflüssigt und dann durch eine absteigende Alkoholreihe entfernt. Dabei werden die Schnitte zweimal für 5 min in Xylol, dann jeweils 2 min in 99 %, 95 %, 70 %, 50 % und 30 % Ethanol geschwenkt und schließlich zweimal 10 min in PBS gewaschen.

3.23.2 Immunfärbung der Paraffinschnitte

Nach dem Entparaffinieren der Schnitte werden zunächst unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem man sie für 20 min bei Raumtemperatur mit Normalserum der Spezies inkubiert, aus der der Sekundärantikörper stammt. Das Serum wird dafür im Verhältnis 1 : 5 mit PBS verdünnt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dazu wird das Serum abgegossen und dann die Schnitte mit dem Primärantikörper bzw. –serum in seiner Gebrauchsverdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Um das Verdunsten des Antikörpers zu verhindern, werden die Schnitte dabei in einer feuchten Kammer gelagert. Am nächsten Tag wird dreimal 5 min mit PBS gespült und dann für 1 h bei Raumtemperatur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper in seiner Gebrauchsverdünnung inkubiert. Diese Inkubation sollte im Dunkeln erfolgen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Anschließend wird erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Schließlich werden die Schnitte unter Verwendung von Dako[®] Fluorescent mounting medium

eingedeckelt. Nachdem das Fluorescent mounting medium vollständig ausgehärtet ist, können die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.24 Auswertung

3.24.1 Verwendete Computerprogramme

Die Homologie von Sequenzen wurde im Internet mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen.

Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit dem Programm Sequencing Analysis der Firma PE Applied Biosystems.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der MIC-Gene im Rhesusaffen

4.1.1 Untersuchung zur Anwesenheit der drei MIC-Gene beim Rhesusaffen

Aus der Literatur (Seo et al., 1999; 2001) ist bekannt, dass es beim Rhesusaffen drei verschiedene funktionelle MIC-Gene gibt, die mit Mamu-MIC1, Mamu-MIC2 und Mamu-MIC3 bezeichnet werden. Genomische Untersuchungen an einigen Rhesusaffen haben jedoch gezeigt, dass nicht immer alle drei MIC-Gene in einem Individuum vorhanden sein müssen. Um diesen An- und Abwesenheitspolymorphismus näher zu untersuchen, sollte anhand von verschiedenen Rhesus-DNA-Proben die Variabilität der Anwesenheit der drei MIC-Gene untersucht werden.

Um zu bestimmen, welche der drei MIC-Gene im Genom eines Individuums vorhanden sind, wurde eine MIC1-, MIC2- bzw. MIC3-spezifische PCR etabliert. Grundlage für die Primerwahl für diese PCR sind neben Nukleotidaustauschen auch zwei Deletionen, durch die sich die drei MIC-Gene im Rhesusaffen voneinander unterscheiden (Abb. 1).

```

MIC1*01
MIC3      GAGACAGACCTGTGTGTTAAACATCGATGTTAAGTTATTTCCAGGAAGAAGTTTCATCTG
MIC2      ACAGCAGACCTGTGTGTTAAACATCGATGTTAAGTTATTTCCAGGAAGAAGTTTCATCTG
                                     MIC-5s AAGTTACTTCCAGGAAGAGGTTTCA

                                     Exon 2
MIC1*01      GAGCTCCACAGTCTTTCGTTACAATGTCACGGTGCTGTCCCGGG
MIC3      TGGTTTTCTCTTCCCCAGAGCTCCACAGTCTTTCGTTACAACGTCACGGTGCTGTCCCGGG
MIC2      TGATTTCTCTTCCCCAGAGCTCCACAGTCTTTCGTTACAACGTCACGGTGCTGTCCCGGG

MIC1*01      ATGGATCTGTGCAGTCAGGGTTTCTCGCTGAGGGACATCTGGATGGTCAGCTCTTCCTGC
MIC3      ATGGATCTGTGCAATCAGATTTTCTCGCTGAGGGACATTTGGATAGTCAGCTCTTCGTGC
MIC2      ATGGATCTGTGCAGTCAGAGTTTCTTGCTGAGGGACATCTGGATGGTCAGCTCTTCGTGC

                                     MIC2-5e CTCCTGG
MIC1*01      TCTATGACAGGCAGAAATGCAGGGCAAGGCCCCAGGGAGAGTGGTCAGAAGATGTCCTGG
MIC3      GCTATGACAGGGAGACGCGCAGGGCAAGGCCCCAGGGACAGTGGGCAGAAGCAGTCCTGG
MIC2      GCTATGACAGGGAGACGCGCAGGGCAAGGCCCCAGGGACAGTGGGCAGAAGCAGTCCTGG
                                     MIC-5e GTCCTGG

GAG          ACCAAGAGACC
MIC1*01      GAGCTAAGACCTGGGACACAGAGACTGGGGACTTGACAGAGAACGGGAAGGACCTCAGGA
MIC3      GAGCTAAGACCTGGGACACAGAGACTGGGGACTTGACAGAGAACGGGAAGGACCTCAGGA
MIC2      GAG*****ACCAAGAGACCGAGGACTTGACAGAGAATGCGCAGGACCTCAGGA
GAGCTAAGACATGG

```

		Intron 2
MIC1*01	TGACCCTGGCTCATATCAAAGGCCAGAAAGGAGGTGAGAGTGGGCAGCGGGGAGAG****	
MIC3	GGACTCTGACTCATATTTGAGGGCCAGAAAGGAGGTGAGAGCGGGCAGGGCAAGAGTAAT	
MIC2	GGACTCTGACTCATATTTGAGGGCCAGAAAGGAGGTGAGTGCGGGCAGGGCAAGAGTAAT	
MIC1*01	*****GCTTTTTTCCAGAAAAGTTAGGGGGAGAGAGCAGGGACC-TGTCTTCCCACTGAAT	
MIC3	GGGAGGCCTTCTCCAGGAGTGTGGAGGCAGAGAGCAGGACCCGTCTCTTCCCTGCTGGTT	
MIC2	GGGAGGCCTTCTCCAAGAGAGTTGGAGGCAGAGAGCAGGACCCGTCTCTTCCCTGCTGGTT	
MIC1*01	CTGGCTCGGGCTAGGGGTGACAAATGGGGGTGAGTGGATCTCAGCAGGGAGGTGAGCCGG	
MIC3	CTGGCTGGGGGTGGGGGTGAGGAGTAGG**TCAGTGGGGCTCAGCAGGGTGGTGGAGCCAG	
MIC2	CTGGCTGGGGGTGGGGGTGAGGAGTAGG**TCAGTGGGGCTCAGCAGGGAGGTGAGTCGG	
MIC1*01	CACTCAACCCACACGGGGTGGCATGGAGGAGGGCCAGGGAGGGGTACCCCTGGGCTGAG	
MIC3	CACTCAGCCACACCGGGAGGCATGGAGGAGGGCCAGGGAGGTGTCCCTGCTGGGCTGAG	
MIC2	CACTCAGCCACACAGGGAGGCATGGAGGAGGGCCAGGGAGGTGTCCCTGCTGGGCTGAG	
MIC1*01	TTCTCACTTTCAGTAGAAAGGTGATGGTTTTCGGGAATGGAGAAAGTCACTGCTGGGTGGGG	
MIC3	TTCTCACCTGAGTGGAAAGGTGACGGTTTTCGGGAATGGAGAAAGTCACTGCTGGGTGGGG	
MIC2	TTCTCACCTGAGTAGAAAGGTGACGGTTTTCGGGAATGGAGAAAGTCACTGCTGGGTGGGG	
		Exon 3
		MIC-18 3' TTGACTCTAGATACTTCTAC 5'
MIC1*01	GCAGGCTTGCATTCTCTCCAGGAGATTAAGGTCTGTGAGATTCATGAAGACACAGCACC	
MIC3	GCAGGCTTGCATTCCCTCCAGGACATTCAGAACTGTGAGATCTATGAAGATGGCAGCACC	
MIC2	GCAGGTTTGCATTCCCTCCAGAAGATTAAGAATCTGTGAGATCTATGAAGACGGCAGCACC	
MIC1*01	GGGGGCTTGCGGCATTCTACTACGATGGCGAGCTCTTCCCTCTCCAAAACCTGGAGACT	
MIC3	GGGGGCTCCCGGCATTCTACTACGATGGTGAGCGCTTCCCTCTCCCTAAACCTGGCGACT	
MIC2	GGGGGCTTCTGGCATTCTACTACGATGGTGAGCTCTTCCCTCTCCCTAAACCTGGAGACT	
		MIC-5t 3' GAGACTTGTAGTCCTTA
MIC1*01	CAGGAATGGACAGAGCTCCAGTCCTCCAGAGCTCAGACCTTGGCTCTGAACATCAGGAAT	
MIC3	CAGGAATGGACAGTGGCCCAGTCCTCCAGAGCTCAGACCTTGGCTATGAA*****T	
MIC2	CAGAAATGGACAGTGGCCCAGTCCTCCAGAGCTCAGACCTTGGCTATGAA*****T	
		AAGACC 5'
MIC1*01	TTCTGGAAGGAAGATAACCATGAAGACCAAGACACACTATCGCACTGTGCAGGCAGACTGC	
MIC3	TTCTGGAAGGAAGATAACCATGAAGACCAACACACACTATCACGCTATGCAGGCAGACTGC	
MIC2	TTCTGGAAGGAAGATAACCATGAAGACCAACACACACTATCGCGCTATGCGGGCAGACTGC	
MIC1*01	CTGAAGAAACTACAGCAATATCTAGAATCCAGGGTGGCCGTCAGGAGAACA	
MIC3	CTGAAGAAACTACGGCGATATCAGAAATCCAGGGTGGCCGTCAGGAGAACA	
MIC2	CTGAAGAAACTACGGCGATATCAGAAATCCAGGGTGGCCGTCAGGAGAACA	

Abb. 1 : Vergleich der MIC1-, MIC2- und MIC3-Sequenzen in dem für die genomische Unterscheidung relevanten Bereich

Die Sequenzen für MIC2 und MIC3 stammen aus der Sequenzierung der Cosmid-Klone H17173 und A158 (unveröffentlichte Daten von INOKO et al., persönliche Mitteilung). Die MIC1-Sequenz findet sich in der EMBL-Datenbank (AJ242438). Für MIC1 ist keine Sequenzinformation für das Intron 1 verfügbar. Die Sterne (*) geben die Deletionen an. Die Primer sind in rot gekennzeichnet.

In dieser PCR wird mit der Primerkombination MIC-5s und MIC-5t spezifisch MIC1 amplifiziert, während die Kombination MIC2-5e und MIC 18 nur MIC2 und die Kombination MIC-5e und MIC 18 nur MIC3 amplifiziert. Auf diese Weise wurden zunächst die DNA der drei in dieser Arbeit näher untersuchten

Rhesusaffen 1801, 6442 und 1641 auf das Vorhandensein der drei MIC-Gene hin analysiert (Abb. 2). Es zeigte sich dabei, dass in dem Rhesusaffen 1801 nur das MIC3-Gen vorhanden ist. Bei den Affen 6442 und 1641 sind dagegen alle drei MIC-Gene nachweisbar. Zusätzlich wurde die DNA von 42 weiteren Rhesusaffen untersucht, um die Verteilung der drei MIC-Gene in weiteren Individuen zu studieren (Tab. 4).

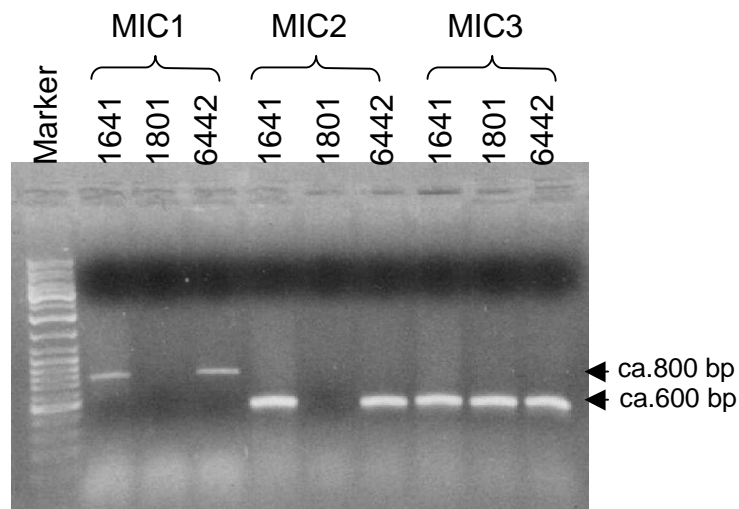


Abb. 2: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Identifizierung der drei MIC-Gene in den drei Rhesusaffen mit den Nummern 1641, 1801 und 6442
Links ist der Längenstandard gezeigt

Tab. 4: Genotypisierung von 45 verschiedenen Rhesusaffen für die Gene MIC1, MIC2 und MIC3

Das Vorhandensein des Gens wird durch ein „+“ die Abwesenheit durch ein „-“ symbolisiert.

Tier Nr.	MIC1	MIC2	MIC3	Tier Nr.	MIC1	MIC2	MIC3
3c	+	+	-	1641	+	+	+
016	-	-	+	1660	+	+	+
037	-	-	+	1666	+	+	+
038	-	-	+	1801	-	-	+
039	-	-	+	1893	-	+	+
040	+	+	+	6197	+	+	+
043	-	-	+	6442	+	+	+
044	-	-	+	6572	+	+	+

045	-	-	+	6574	+	-	+
046	+	+	+	6575	+	+	+
047	-	-	+	6576	+	-	+
048	-	-	+	6577	-	-	+
051	-	-	+	9306	-	-	+
122	-	-	+	10037	-	-	+
123	-	-	+	10670	-	+	+
124	+	+	+	10926	-	-	+
125	+	+	-	10940	-	+	+
126	+	+	+	10942	+	-	-
130	+	-	+	11106	+	-	+
141	+	+	+	11111	+	-	+
1030	+	+	+	11112	-	+	+
1610	+	+	+	11118	+	+	+
1622	+	-	+				

Bei den insgesamt 45 auf diese Weise untersuchten Rhesusaffen zeigt sich, dass bei 15 Individuen (33,3%) alle drei MIC-Gene auftreten, bei 12 Tieren (26,7%) finden sich zwei und bei 18 Affen (40%) sogar nur ein MIC-Gen. Das am häufigsten vorkommende Gen ist MIC3, das bei den 45 untersuchten Affen 42 mal vorhanden war (93,3%). MIC1 trat dagegen 24 mal (53,3%) und MIC2 nur 21 mal (46,7%) auf. Von den Tieren, die nur ein MIC-Gen aufweisen, tragen 17 MIC3 und nur eins MIC1. Die diesen Untersuchungen zugrunde liegenden Gewebe und DNA-Proben stammen fast ausschließlich aus dem Deutschen Primatenzentrum (siehe 2.1.1), wobei die verschiedenen Rhesusaffen-Individuen jedoch von verschiedenen Quellen bezogen wurden, so dass enge Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Tiere - und ein daraus resultierendes gehäuftes Auftreten bestimmter Haplotypen - sehr unwahrscheinlich ist.

4.1.2 Die EBV-transfizierte B-Zell-Linie 1641

Für einen Teil der MIC-Expressionsuntersuchung im Rhesusaffen wurde eine B-Zell-Linie des Rhesusaffen 1641 verwendet. Diese Zelllinie stammt aus dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen und ist dort durch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert worden. Aus diesem Grund können diese Zellen unter den normalen Zellkulturbedingungen in E⁺-Medium gehalten und vermehrt werden.

Bei dem Rhesusaffen (1641), aus dem diese Zelllinie stammt, konnte mittels PCR (Abb. 2) das Vorhandensein aller drei MIC-Gene festgestellt werden. Nun stellte sich die Frage, ob in dieser B-Zell-Linie diese Gene auch exprimiert werden.

Hierzu wurde aus den Zellen Gesamt-RNA gewonnen (siehe 3.1.2) und über ein Agarosegel aufgetrennt. Nach der Übertragung dieser RNA auf eine Nitrocellulose-Membran wurde in einer Northernblot-Analyse unter Verwendung der Hybridisierungssonde 1 (siehe 2.3.9) das Vorhandensein von MIC-RNA untersucht (Abb. 3a). Dabei zeigten sich drei spezifische Banden in einer Höhe von ca. 2,0 kb, 2,5 kb und 2,8 kb. Aus weiter unten geschilderten Experimenten mit MIC2- und MIC3-transgenen Mäusen ergibt sich, dass die 2,5 kb-Bande wahrscheinlich MIC3 und die 2,8 kb-Bande MIC2 entspricht, so dass die 2,0 kb-Bande vermutlich MIC1 repräsentiert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass MIC1, MIC2 und MIC3 in dieser Zelllinie auf RNA-Ebene exprimiert werden.

Um diesen Befund zu bestätigen und zu erweitern, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt (siehe 3.8). Dabei wurden die Primer MIC 5' utr und MICA-2 eingesetzt, mit denen potentiell MIC1, MIC2 und MIC3 amplifiziert werden können. Das aus dieser PCR resultierende Amplifikat wurde aus dem Agarosegel eluiert (siehe 3.10) und in den pDRIVE-Vektor kloniert. Aus 20 Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA gewonnen (siehe 3.1.3) und durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRI auf das Vorhandensein des Inserts untersucht. Von den 20 untersuchten Klonen enthielten 10 ein Insert der erwarteten Länge und wurden unter Verwendung des Primers MIC 5' utr ansequenziert. Dabei ergaben sich 5 Klone für MIC1, 2 Klone für MIC2 und 3 Klone, die MIC3 enthielten. Durch das Auftreten von Klonen für alle drei dieser

MIC-Gene konnte bestätigt werden, dass in dieser Zelllinie auf der RNA-Ebene MIC1, MIC2 und MIC3 exprimiert werden.

Da das Vorhandensein der MIC-RNA nicht zwingend bedeutet, dass die MIC-Proteine auch synthetisiert und an die Zelloberfläche transportiert werden, sollte die Expression auch auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) inkubiert (siehe 3.14) und nach Inkubation mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper im Durchflußzytometer gemessen (siehe Abb. 3b). Die Messung ergab eine Zunahme der mittleren Fluoreszenz von 6 bei der Kontrollfärbung mit dem Nullserum zu 15 bei der Reaktion mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) (s.u. 4.3.4). Diese, wenn auch geringe, Zunahme der Fluoreszenz zeigt, dass MIC-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Eine Unterscheidung darüber, ob es sich dabei um MIC1-, MIC2- bzw. MIC3-Moleküle handelt, war mit den vorhandenen Antisera allerdings nicht möglich.

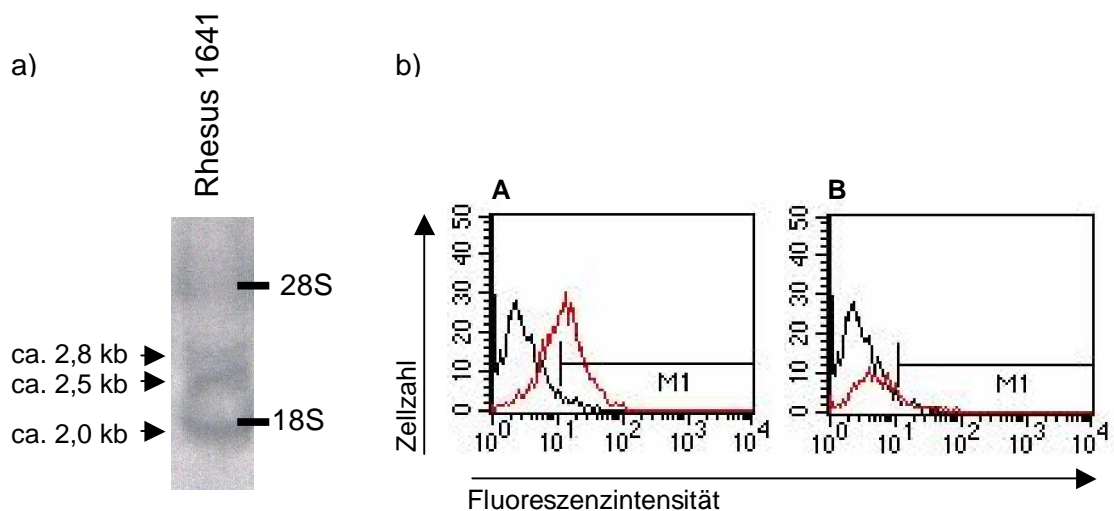


Abb. 3: Analyse der MIC-Expression in der B-Zelllinie des Rhesusaffen 1641

a) Northernblotanalyse der RNA mit der Hybridisierungssonde 1

Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind eingezeichnet.

b) Durchflußzytometrische Analyse der MIC-Expression auf der Oberfläche der Zelllinie 1641

Schwarz = Färbung nur mit dem Sekundärantikörper. Rot = Anti-MIC-Antikörper (FVB) (A) bzw. Nullserum (B) und Sekundärantikörper. Im Bereich des Markers M1 liegen bei der Färbung mit dem Sekundärantikörper weniger als 2 % der Zellen.

4.1.3 Untersuchung der MIC-Expression im Rhesusaffen mittels Northernblot und RT-PCR

Die MIC-Expression im Rhesusaffen wurde zunächst auf RNA-Ebene anhand von Northernblot-Analysen untersucht. Als Material zur RNA-Präparation standen dazu die Gewebe Milz, Lymphknoten, Muskel, Herz, Haut, Lunge, Leber, Niere, Magen, Dünndarm, Dickdarm und Ovar von einem weiblichen Rhesusaffen (Nr. 1801) zur Verfügung und zusätzlich Gewebeproben vom Testis eines männlichen Tieres (Nr. 6442). Aus diesen Geweben wurde die Gesamt-RNA präpariert und nach der Auftrennung über ein Agarosegel auf Nitrocellulose geblottet. Die Northernblot-Analyse dieser RNA unter Verwendung der Hybridisierungssonde 2 (siehe 2.3.9) ergab dabei eine starke MIC-Expression im Testis des männlichen Affen 6442 und eine wesentlich schwächere Expression in Dickdarm, Dünndarm, Magen und Milz des weiblichen Rhesusaffen 1801 (Abb. 4).

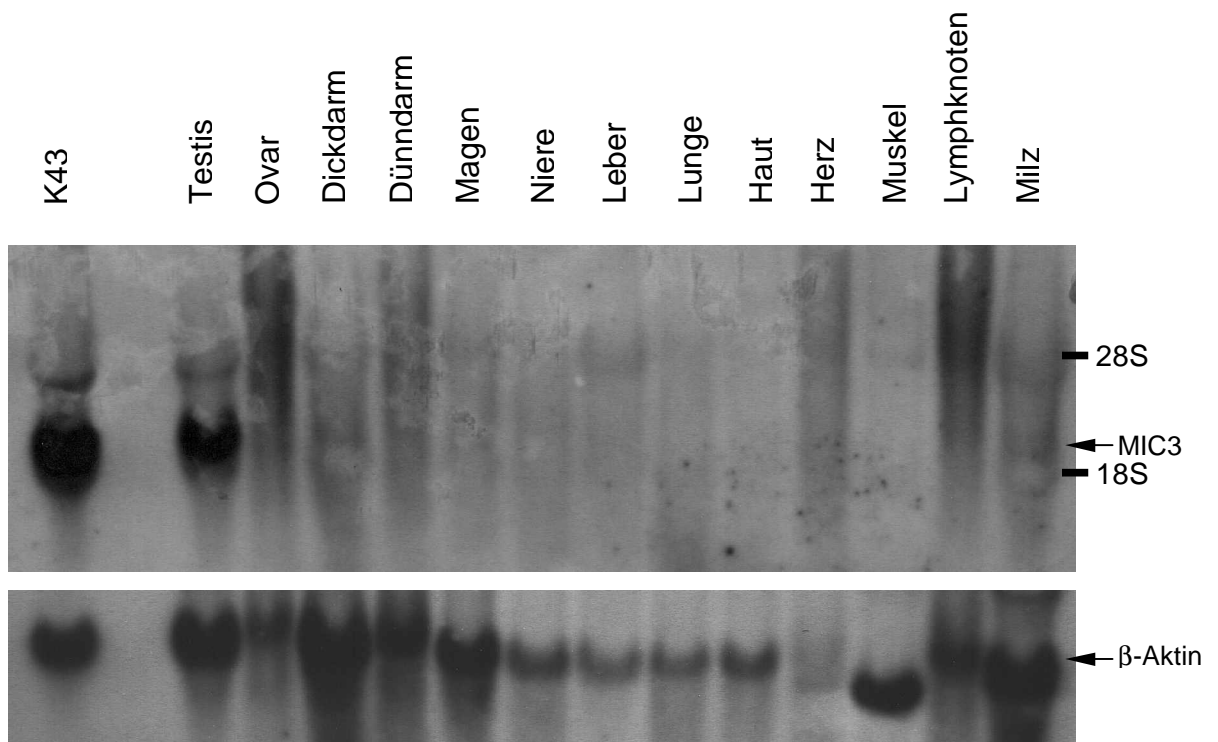


Abb. 4: Northernblot-Analyse von RNA aus dem Testis des Rhesusaffen 6442 und verschiedenen Organen des Rhesusaffen 1801, der nur das MIC3-Gen besitzt, mit der Hybridisierungssonde 2 (MIC3-Exon 2 bis 4) RNA der MIC3-Transfektante K43 (siehe 4.2) diente als Positivkontrolle. Der Röntgenfilm wurde 5 Tage exponiert. Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind eingezeichnet. Zum Vergleich der RNA-Mengen ist im unteren Teil der gleiche Blot mit der β -Aktin-Probe rehybridisiert.

Um diese Befunde aus der Northernblot-Analyse zu bestätigen und MIC-Expression in Organen zu detektieren, bei denen sie unterhalb der Nachweisgrenze für diese Methode liegt, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus den Rhesusaffenorganen unter Verwendung von Random-Primern in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann als *template* in einer PCR mit den Primern MIC-Bakt 5' und MIC-Bakt 3' eingesetzt. Diese Primer flankieren einen etwa 800 Basenpaare langen Bereich von Exon 2 zu Exon 4. Bei dieser PCR lässt sich eine Verfälschung des Ergebnisses durch Reste von genomischer DNA ausschließen, da ein solches PCR-Produkt durch die Introns deutlich länger wäre.

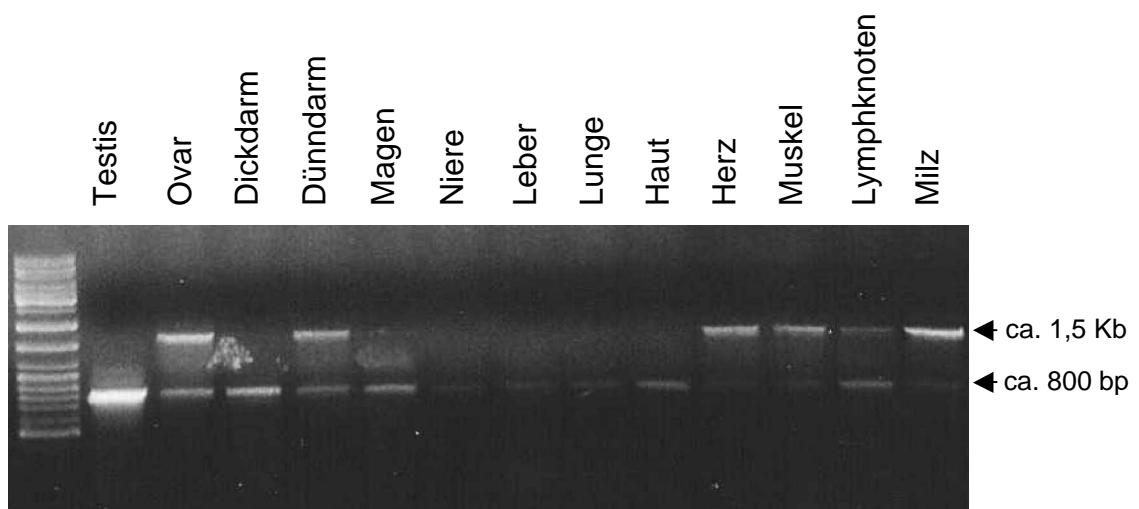


Abb. 5: MIC-Nachweis in verschiedenen Organen von Rhesusaffen mittels RT-PCR. Die MIC-RT-PCR-Bande liegt auf der Höhe von etwa 800 bp. Die Banden von 1,5 kb Länge sind Amplifikate von genomischer DNA. In der PCR-Reaktion wurden ca. 100 ng cDNA eingesetzt. Links ist der Längenstandard gezeigt.

Mit Hilfe der RT-PCR lässt sich eine MIC-Expression auf RNA-Ebene in allen getesteten Geweben nachweisen (Abb. 5). Allerdings musste dafür eine relativ hohe cDNA-Menge eingesetzt werden.

Die bei dieser PCR auftretenden längeren Banden von 1,5 kb sind auf eine Verunreinigung der RNA und damit auch der cDNA durch genomische DNA zurückzuführen. Nach Durchführung dieser Expressionsuntersuchung konnte die Genotypisierung der beiden Affen durchgeführt werden (siehe 4.1.1), wobei festgestellt wurde, dass das männliche Tier 6442 alle drei MIC-Gene aufweist,

während der weibliche Rhesusaffe 1801 nur das MIC3-Gen besitzt. Daher gelten die Expressionsergebnisse in diesem Tier nur für MIC3.

Das Vorhandensein aller drei MIC-Gene in dem Rhesusaffen 6442 eröffnete die Möglichkeit, durch eine für MIC1-, MIC2- und MIC3-spezifische RT-PCR (siehe 4.1.1) zu untersuchen, welche der drei MIC-Gene im Testis transkribiert werden. Bei dieser PCR ergab sich für alle drei Primerkombinationen ein Amplifikat (Abb. 6). Damit konnte der an der EBV-Zelllinie erhobene Befund einer gleichzeitigen Expression aller drei MIC-Gene (siehe 4.1.2) an Rhesusaffengewebe bestätigt werden.

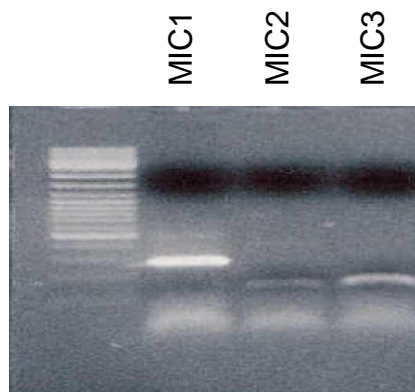


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Identifizierung der drei MIC-Gene in Testis-cDNA des Rhesusaffen 6442
Die unterschiedlichen Längen ergeben sich aus den verschiedenen Primerkonstellationen (siehe 4.1.1). Links ist der Längenstandard gezeigt.

4.1.4 Immunhistologische Untersuchung der MIC-Expression an Paraffinschnitten von Rhesusaffen

Um die MIC-Expressionsuntersuchungen im Rhesusaffen von der RNA-Ebene auch auf die Proteinebene auszudehnen, wurden immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten von verschiedenen Rhesusaffengeweben durchgeführt.

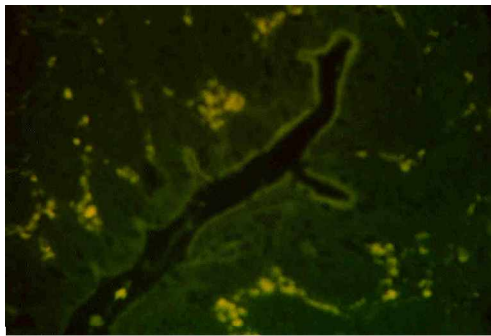
Für diese immunhistologischen Untersuchungen wurden von Prof. F.-J. Kaup (Deutsches Primatenzentrum) Paraffinschnitte zur Verfügung gestellt. Diese Schnitte stammen zum einen von einem männlichen Rhesusaffen (Nr. 6197), der ein Jahr nach einer experimentellen SIV-Infektion an einer Darmentzündung

(Enteritis) erkrankte und daher getötet werden musste, und zum anderen von einem nicht mit SIV infizierten ebenfalls männlichen Kontrolltier (Nr. 6283) ohne Enteritis. Die Schnitte von beiden Tieren beinhalten Gewebe aus Zentralnervensystem, Großhirn, Kleinhirn, Medulla, Pons, Leber, Niere, Milz, Lunge, Herz, Magen, Magenlymphknoten, Speiseröhre, Dünndarm, Pankreas, Dickdarm, Tonsille, Thymus, peripheren Lymphknoten, Knochenmark, Hoden, Schilddrüse, Nebenniere, Parotis, Harnblase, Gallenblase, Haut und Muskulatur.

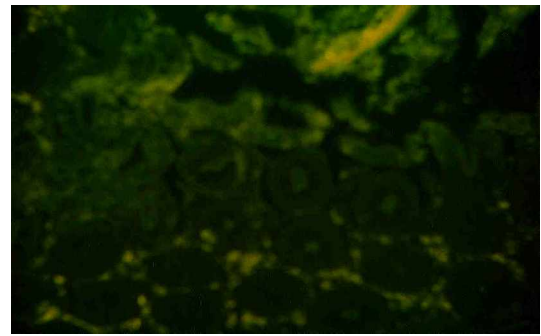
Der Nachweis der MIC-Moleküle in diesen Schnitten sollte durch Verwendung des Anti-MIC-Antiserums (FVB) erfolgen (siehe 4.3.4). Um durch das Paraffin maskierte Epitope für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Schnitte zunächst wie unter 3.23.1 beschrieben entparaffiniert und rehydratisiert. Dann folgte die Immunreaktion der Schnitte mit einer Verdünnung des Antiserums von 1:100 in PBS wie unter 3.23.2 beschrieben. Der Nachweis der gebundenen MIC-Antikörper erfolgte durch eine Färbung mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper. Die Auswertung der auf diese Weise gefärbten Paraffinschnitte erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei zeigte sich nach der Inkubation mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) lediglich auf den Dünndarmschnitten des erkrankten Tieres 6197 eine spezifische Fluoreszenz, die auf die Epithelzellen des Dünndarms beschränkt ist (Abb. 7). Die Paraffinschnitte der anderen untersuchten Gewebe zeigten keine spezifische Anfärbung mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB).

Die als Kontrolle parallel an den Paraffinschnitten des nicht mit SIV infizierten Tieres (Nr. 6283) durchgeführte Immunfärbung zeigte auch bei diesem Tier nur eine MIC-Expression im Dünndarm. Allerdings scheint die Fluoreszenz schwächer zu sein als im Darm des mit SIV infizierten Tieres, und sie ist nicht durchgehend in allen Epithelzellen zu finden, sondern fast ausschließlich in den Krypten (Abb. 7). Dieser Unterschied der MIC-Expression zwischen den zwei Tieren fand sich so auch in anderen Gesichtsfeldern des Präparats und ließ sich in weiteren Dünndarmschnitten dieser Tiere reproduzieren.

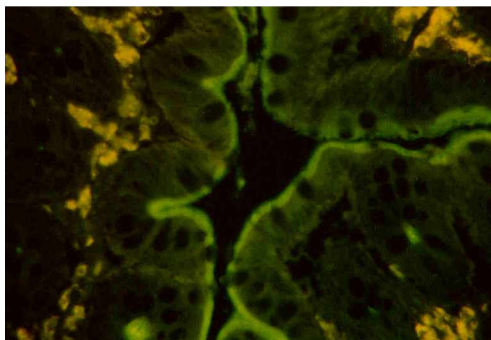
Die Genotypisierung des Tieres 6197 ergab die genomische Anwesenheit aller drei MIC-Gene (siehe Tab. 4). Für das Tier 6283 stand keine DNA zur Verfügung, so dass keine Genotypisierung erfolgen konnte.



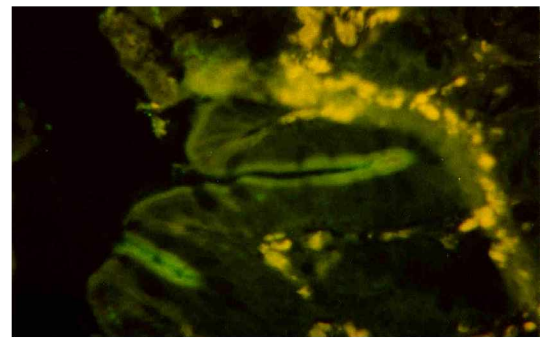
A. SIV-Tier Nullserum



C. Kontrolltier Nullserum



B. SIV-Tier Anti-MIC-Antikörper



D. Kontrolltier Anti-MIC-Antikörper

Abb. 7: Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten des Dünndarms des SIV-infizierten Rhesusaffen 6197 (**A+B**) und des nicht mit SIV infizierten Kontrolltieres 6283 (**C+D**)

A+C Kontrollfärbungen mit dem Nullserum (1:100 in PBS verdünnt), **B+D** Färbungen mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) (1:100 in PBS verdünnt). Die leuchtend hellgrün gefärbten Bereiche des Dünndarmepithels repräsentieren die spezifisch mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) angefärbten Zellen.

4.2 Analyse MIC-exprimierender Transfektanten-Klone der Maus

4.2.1 Etablierung von Zellklonen nach Transfektion mit einem MIC3-Cosmid

Als Hilfsmittel zur Untersuchung der MIC-Moleküle wurden L-Zellen, eine Fibroblastenzelllinie der Maus, mit dem MIC3-tragenden Cosmid A158 (SEO et al., 2001) durch Elektroporation transfiziert (siehe 3.13.7).

Nach der Selektionierung mit dem Antibiotikum Geneticin (1 mg/ml) wurden die resistenten Klone in einer PCR unter Verwendung der Primer MIC 7 und MIC 16 auf das Vorhandensein der MIC-Cosmid-DNA untersucht. Auf diese Weise wurden 12 Klone identifiziert, die die MIC-Cosmid-DNA enthielten. Zur Überprüfung der Transkription der MIC-Gene wurde zunächst eine Northernblot-Analyse (siehe 3.6) dieser PCR-positiven Klone mit der Hybridisierungssonde 1 (siehe 2.3.9) durchgeführt (Abb. 8). Diese Hybridisierung ergab bei den Klonen K33 und K43 starke und bei den Klonen K28 und K42 schwächere Signale. Um diesen Befund abzusichern, wurde bei den beiden Klonen mit der stärkeren Expression eine RT-PCR mit den Primern MIC 7 und MIC 16 durchgeführt und das PCR-Produkt ansequenziert. Die dabei ermittelte Sequenz entsprach der für MIC3. Auf diese Weise konnte bei den Klonen K33 und K43 die Expression von MIC3 in der L-Zelllinie der Maus auf RNA-Ebene bestätigt werden.

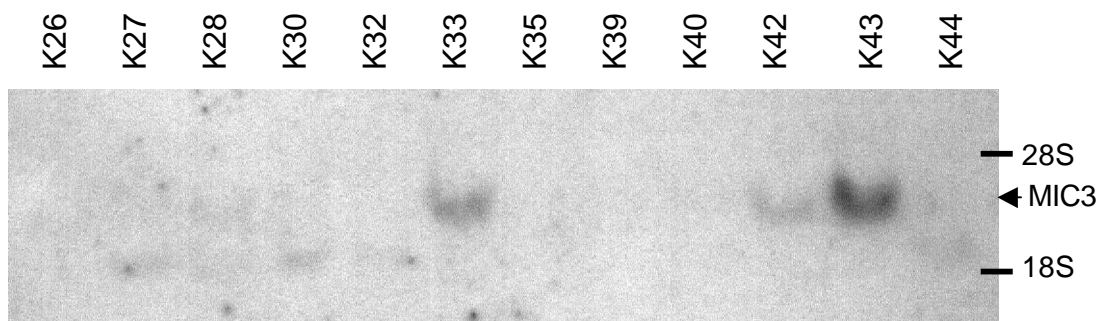


Abb. 8: Northernblotanalyse von MIC3-transgenen L-Zell-Klonen mit der Hybridisierungssonde 1
Die Positionen der 18S und 28S rRNA sind angegeben.

4.2.2 Funktionelle Untersuchung der MIC-Expression

Die Translation der MIC-RNA und das Vorhandensein des MIC-Moleküls an der Zelloberfläche des MIC3-Klon K43 konnte nach der Etablierung des Anti-MIC-Antiserums (FVB) (siehe 4.3.4) mittels Durchflußzytometrie (siehe 3.14) nachgewiesen werden (Abb. 9).

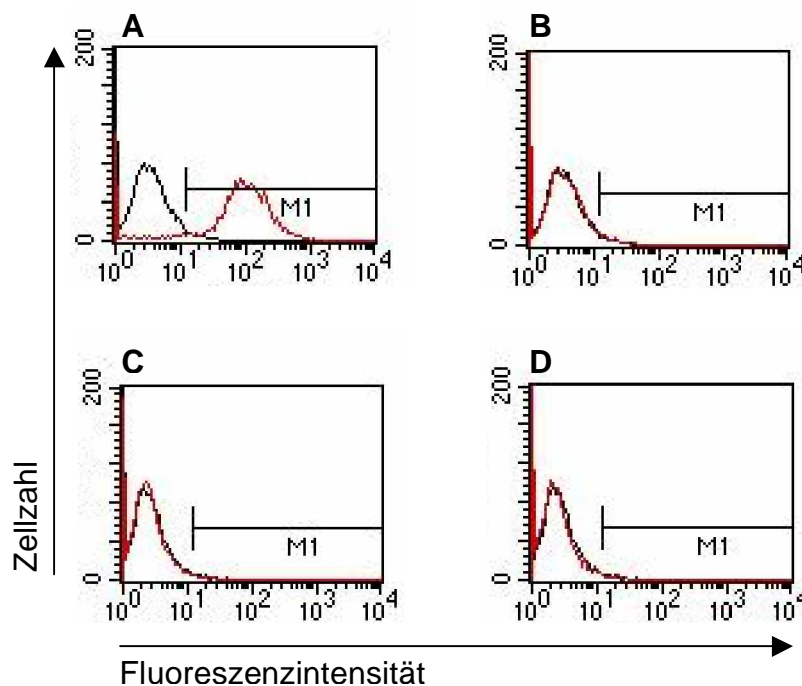


Abb. 9: Durchflußzytometrische Analyse der MIC3-Expression auf der Zelloberfläche der MIC3-L-Zell-Transfektante K43 mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB)
Schwarz = nur mit dem Sekundärantikörper inkubierte Zellen; Rot = mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) inkubierte Zellen.
(A) K43 mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB), (B) K43 zur Kontrolle mit Nullserum, (C) L-Zellen mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) und (D) L-Zellen mit dem Nullserum inkubiert. Der Marker M1 zeigt den Bereich an, in dem weniger als 2 % der nur mit dem Sekundärantikörper gefärbten Zellen liegen.

Nachdem die Expression des MIC3-Moleküls an der Zelloberfläche des MIC3-Klones K43 nachgewiesen werden konnte, sollte nun seine Lysierbarkeit durch Lymphokin-aktivierte natürliche Killer-Zellen (LAK-Zellen) sowohl des Menschen als auch des Rhesusaffen in einem Chromfreisetzungstest (siehe 3.15) untersucht werden. Da frisches Blut von Rhesusaffen als NK-Zell-Quelle viel schwerer und nur in geringen Mengen zu bekommen ist, wurden die Versuche zunächst mit humanen Killerzellen durchgeführt. In einem Chromfreisetzungstest mit den humanen LAK-Zellen (siehe 3.13.5) wurden bei

einem Verhältnis von Killer- zu Zielzellen von 150 : 1 die MIC3-exprimierenden Klone zu 45 % (K43), bzw. 30 % (K33) spezifisch lysiert, während die untransfizierten L-Zellen von den LAK-Killern nicht lysiert werden (Abb. 10). Die als Positivkontrolle mitgeführten K562-Zellen wurden zu etwa 60 % lysiert. Aufgrund der besseren Lysierbarkeit des Klons K43 gegenüber dem Klon K33 wurde jener für alle weiteren Experimente ausgewählt. In einem Chromfreisetzungstest mit LAK-Zellen von Rhesusaffen musste aufgrund der geringen Blutmenge, die dafür zur Verfügung stand, mit einem Verhältnis von Killer- zu Zielzellen von 50 : 1 begonnen werden. Die spezifische Lyse des MIC3-exprimierenden Klons K43 durch die LAK-Zellen konnte nachgewiesen werden, lag allerdings nur bei etwa 12 %. Die als Positivkontrolle mitgeführten K562-Zellen wurden zu 25 % lysiert (Abb. 11) und die untransfizierten L-Zellen zu ca. 5 %. Somit konnte gezeigt werden, dass die MIC3-exprimierenden L-Zellklone durch LAK-Zellen sowohl des Rhesusaffen als auch des Menschen lysiert werden.

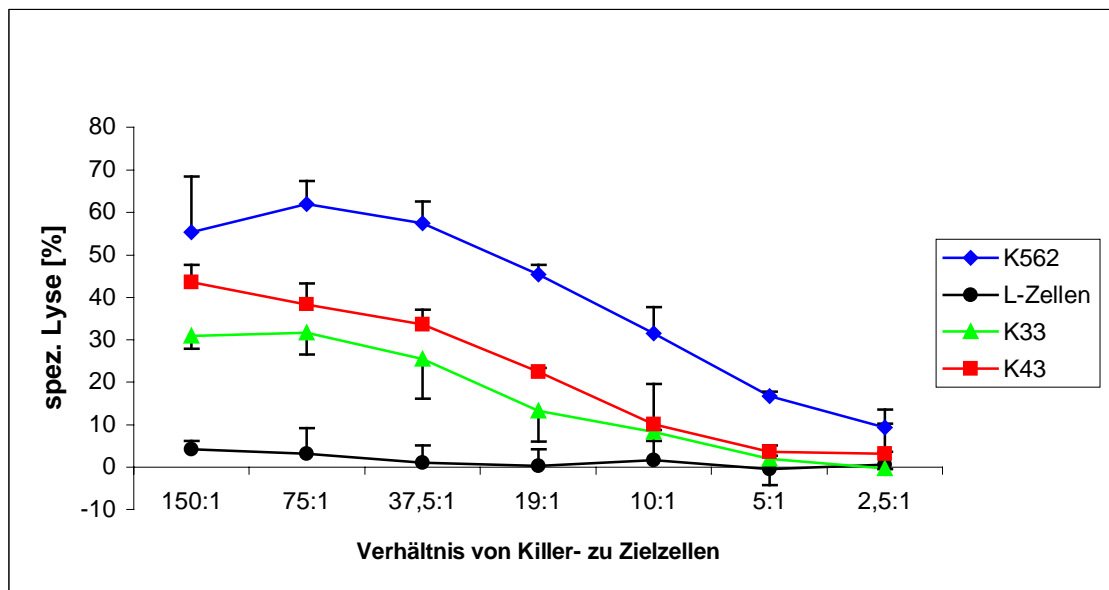


Abb. 10: Lysierbarkeit der MIC3-transfizierten L-Zellklone K43 und K33 durch humane LAK-Zellen in einem Chromfreisetzungstest

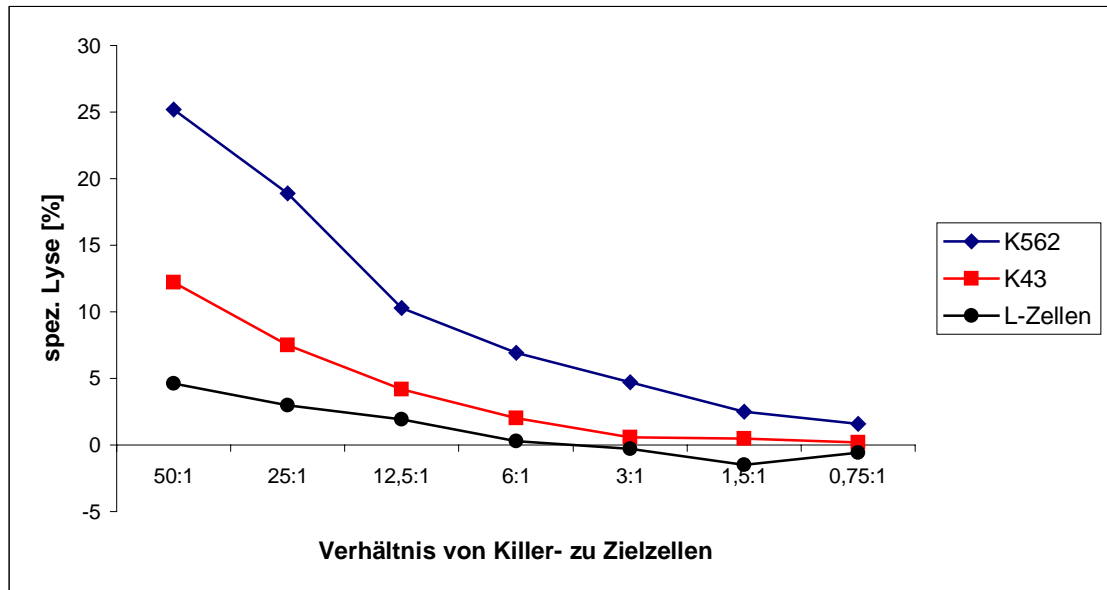


Abb. 11: Lysierbarkeit des MIC3-transfizierten L-Zellklons K43 durch Rhesusaffen-LAK-Zellen in einem Chromfreisetzungstest

4.3 Untersuchungen an MIC2- und MIC3-transgenen Mäusen

4.3.1 Etablierung der transgenen Mauslinien

Parallel zu den transfizierten L-Zellen wurden auch MIC-transgene Mäuse erzeugt. Hierzu wurde zunächst die DNA des bereits erwähnten Cosmid-Klons A158 (MIC3) sowie eines weiteren Cosmid-Klons H17173 (MIC2) mit dem Restriktionsenzym Not I linearisiert und durch eine Phenol/Chloroform-Reinigung aufgereinigt. Mit dieser DNA wurde dann im Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen die Pronukleusinjektion und der Embryotransfer bei FVB-Mäusen durchgeführt (siehe 3.20).

Die daraus resultierenden Tiere wurden vom MPI für Experimentelle Medizin übernommen. Aus Schwanzbiopsien wurde DNA gewonnen (siehe 3.1.1) und über PCR unter Verwendung der Primer MICSonde 5´ und MICSonde 3´ die Integration der Cosmid-DNA im Genom der Tiere überprüft. Insgesamt wurden 6 männliche und 3 weibliche MIC2-transgene Mäuse und 5 männliche und 7 weibliche MIC3-transgene Mäuse identifiziert (nicht gezeigt).

Diese chimärischen Mäuse („Founder“) wurden mit Wildtypmäusen vom FVB-Stamm verpaart und die Nachkommen auf die gleiche Weise genotypisiert, um diejenigen Tiere zu identifizieren, bei denen das MIC-Transgen auch in der Keimbahn integriert ist.

Auf diese Weise konnte eine MIC3-transgene Linie etabliert werden, die auf den männlichen Founder Nr. 9 zurückgeht und im Weiteren als MIC3-9 bezeichnet wird, sowie drei verschiedene MIC2-transgene Linien: MIC2-1, MIC2-7 und MIC2-16, wobei die Linien MIC2-1 und MIC2-16 auf männliche Founder zurückgehen und MIC2-7 auf einen weiblichen Founder.

Alle diese Linien zeigen normale Fertilität und es konnten auch sonst keine auffälligen Beeinträchtigungen festgestellt werden.

4.3.2 Untersuchung der MIC-Expression in den transgenen Mäusen

Zur Untersuchung der MIC-Expression in den transgenen Mäusen wurde zunächst wie bei den Zelllinien eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Dazu

wurde aus den Organen Milz, Thymus, Lymphknoten, Lunge, Leber, Niere, Herz, Gehirn, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Pankreas, Testis und Uterus totale RNA gewonnen, über ein RNA-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Diese wurde dann mit der Hybridisierungssonde 1 (Abb. 12) bzw. mit der Hybridisierungssonde 2 (Abb. 13) hybridisiert. Die Hybridisierungen zeigen übereinstimmend bei den MIC2-transgenen Mäusen nur eine Expression im Testis. Bei der MIC3-Linie konnte mit beiden Proben eine starke Expression im Testis sowie eine schwächere in Leber, Milz, Dickdarm, Lunge und Thymus nachgewiesen werden.

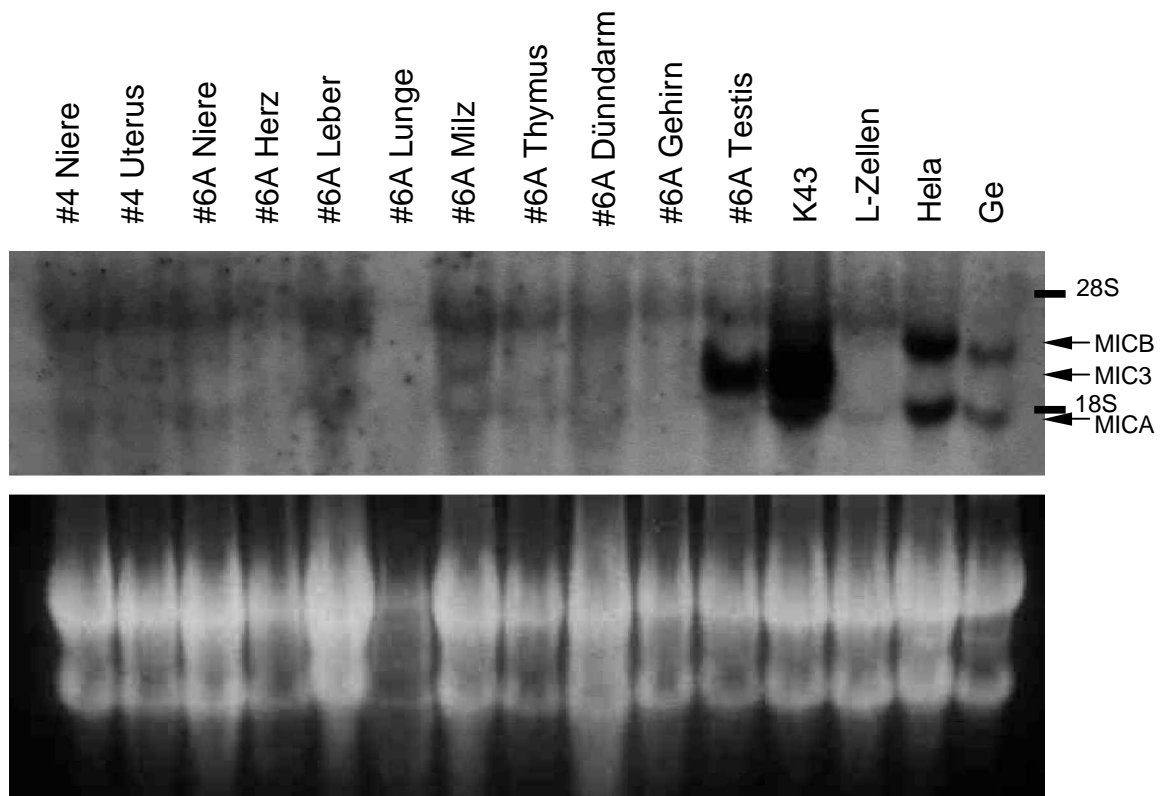


Abb. 12: Northernblot-Analyse von RNA aus verschiedenen Geweben einer weiblichen (#4) und einer männlichen (#6A) MIC3-transgenen Maus, der L-Zelllinie der Maus (L-Zellen) und den humanen Zelllinien Hela und Ge mit der Hybridisierungssonde 1 (MIC1 Ex. 4)

Die hybridisierenden Banden der MIC3-RNA sowie der humanen MICA- und MICB-RNA sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind eingezeichnet.

Im unteren Teil der Abbildung ist das Ethidiumbromidbild des RNA-Gels zum Vergleich der RNA-Mengen gezeigt.

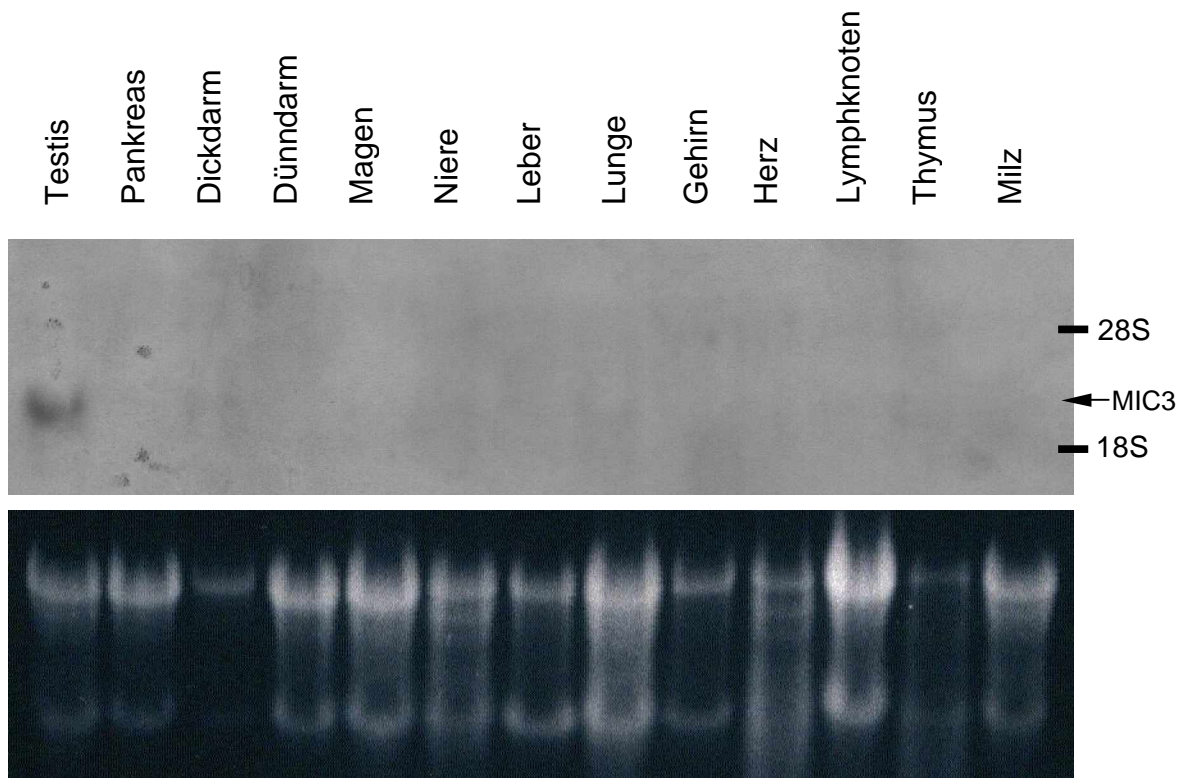


Abb. 13: Northernblot-Analyse von RNA aus verschiedenen Geweben einer männlichen MIC3-transgenen Maus(#70C) mit der Hybridisierungssonde 2 (MIC3 Ex. 2-4)

Die MIC3-hybridisierende Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind eingezeichnet.

Im unteren Teil der Abbildung ist das Ethidiumbromidbild des RNA-Gels zum Vergleich der RNA-Mengen gezeigt.

Da die MIC-Expression vermutlich unter normalen Bedingungen nur gering ist und damit möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze eines Northernblots liegt, wurden zusätzlich Expressionsanalysen mittels RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde cDNA aus den verschiedenen Organen der MIC-transgenen Mäuse in einer RT-PCR mit den Primern MICBakt 5' und MICBakt 3' eingesetzt. Hierbei war in der MIC2-16 Linie wie bei der Northernblot-Analyse nur die MIC-Expression im Testis nachweisbar (nicht gezeigt). Bei der MIC3-transgenen Linie ergab die RT-PCR-Analyse bei Verwendung von 100ng cDNA im Reaktionsansatz eine MIC-Expression in allen getesteten Geweben (Abb. 14). Ähnlich wie im Rhesusaffen liegt aber auch hier in einigen Organen die detektierbare MIC-Expression nahe der Nachweisgrenze für die empfindliche RT-PCR, wie Variationen der PCR-Bedingungen ergeben haben (nicht gezeigt). Insgesamt ergibt sich bei Rhesusaffe und MIC3-transgener Maus ähnliche Expressionsmuster für das MIC3-Gen (siehe Tab. 5).

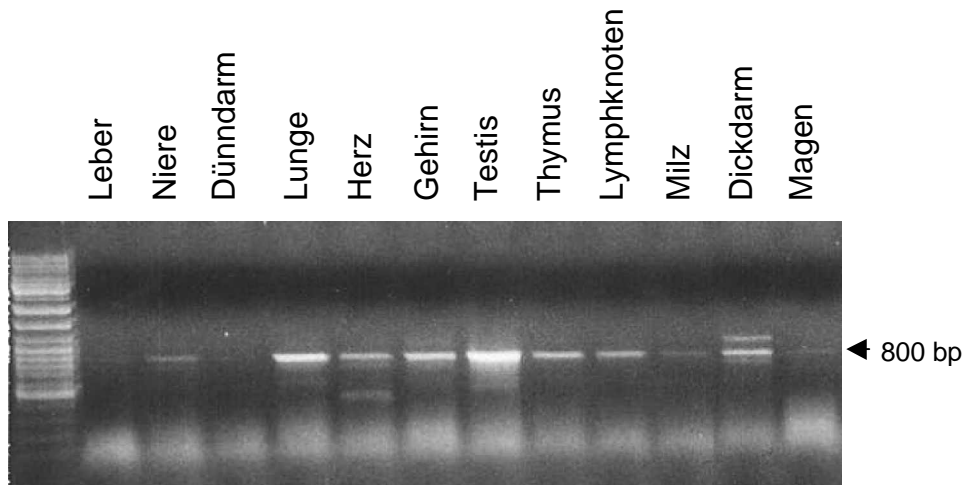


Abb. 14: Nachweis der MIC3-Expression in verschiedenen Organen der MIC3-transgenen Maus 70C mittels RT-PCR
Die MIC-RT-PCR-Bande liegt auf der Höhe von etwa 800 bp und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. In der PCR-Reaktion wurden ca. 100 ng cDNA eingesetzt. Links ist der Längenstandard gezeigt.

Tab. 5: Vergleich der in Northernblot- und RT-PCR-Analysen ermittelten MIC-Expression beim Rhesusaffen und bei der MIC3-transgenen Maus
Eine nachweisbare Expression ist durch ein +, fehlende Expression durch ein – symbolisiert.

Organ	Rhesusaffe		MIC3-transgene Maus	
	Northern	RT-PCR	Northern	RT-PCR
Testis	+	+	+	+
Ovar	-	+	-	+
Dickdarm	+	+	+	+
Dünndarm	+	+	-	+
Magen	+	+	-	+
Niere	-	+	-	+
Leber	-	+	+	+
Lunge	-	+	+	+
Herz	-	+	-	+
Lymphknoten	-	+	-	+
Milz	+	+	+	+

Die Expression der MIC-Moleküle auf der Oberfläche von Milz- und Thymuszellen sollte bei den MIC3-9 Mäusen nach der Etablierung des Anti-MIC-Antiserums (FVB) auch im Durchflußzytometer untersucht werden. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz und dem Thymus einer MIC3-transgenen Maus und zur Kontrolle einer FVB-Wildtypmaus hergestellt. Da in der Zellsuspension der Milz der hohe Anteil an Erythrozyten die durchflußzytometrische Messung stören würde, werden diese vor der Durchflußzytometrie durch eine Erythrozytenlyse (siehe 3.13.3.2) weitestgehend beseitigt. Nach einer indirekten Immunfärbung mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) und zur Kontrolle mit FVB-Nullserum und der anschließenden Inkubation mit einem Fluorescein-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper wurden die Milz- und Thymuszellen im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 15). Bei dieser Messung zeigt sich in der Milz schon durch die Reaktion mit dem Sekundärantikörper allein eine Zunahme der Zellzahl innerhalb des gesetzten Gates von 1,9 % auf 43,6 % bei der MIC3-transgenen Maus und von 2,0 % auf 48,5 % bei der Wildtypmaus, was bedeutet, dass eine Zellpopulation in der Milz mit dem Sekundärantikörper reagiert, die sich in dem Peak mit hoher Fluoreszenz im Bereich von 10^3 bis 10^4 findet. Dabei handelt es sich um die Reaktion des gegen Maus-Immunglobulin gerichteten Sekundärantikörpers mit dem Immunglobulin auf Maus-B-Lymphozyten. Dennoch ist in dieser Messung nach der Reaktion mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) eine Zunahme der Fluoreszenzintensität sowohl bei den Milz- als auch den Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus zu erkennen.

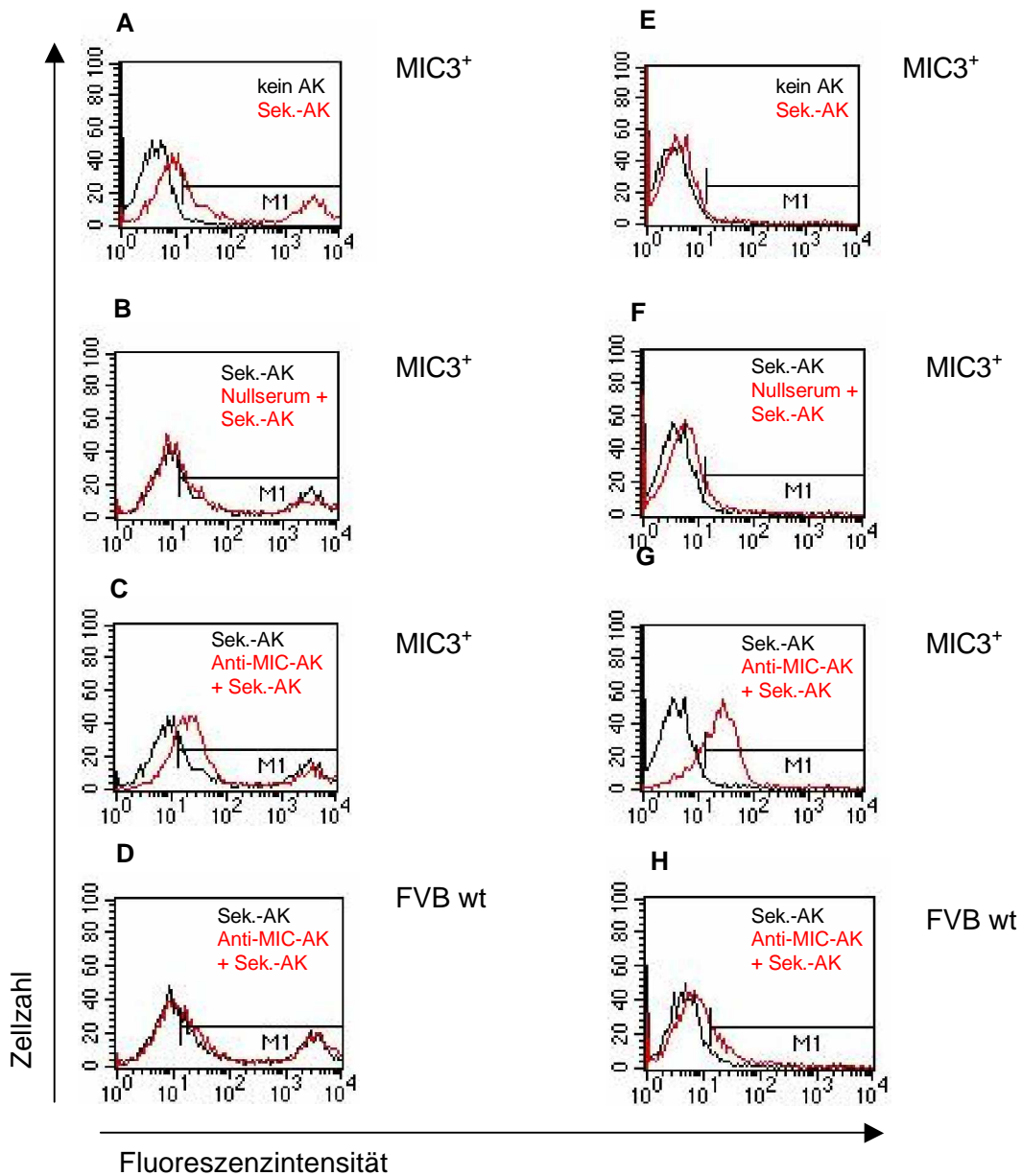


Abb. 15: Durchflußzytometrische MIC3-Expressionsanalyse an Milzzellen einer MIC3-transgenen Maus (A-C) und einer FVB-Wildtyp-Maus (D), sowie an Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus (E-G) und der Wildtyp-Kontrolle (H) mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) (Anti-MIC-AK), dem Nullserum und dem Sekundärantikörper (Sek.-AK)

Der Marker M1 kennzeichnet den Bereich, in dem sich weniger als 2 % der eigenfluoreszierenden Zellen befinden.

Aufgrund der starken Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit den Milzzellen und einer leichten unspezifischen Reaktion des Nullserums mit den Milz- und Thymuszellen wurde dieser Versuch mit fünf MIC3-transgenen und drei

Wildtypmäusen durchgeführt. Betrachtet man nun die Mittelwerte aus der Differenz von den Zellen, die mit dem Nullserum inkubiert wurden, zu denen, die mit dem Antiserum inkubiert wurden, ergeben sich folgende Werte, die allerdings MIC-positive B-Lymphozyten nicht einbeziehen würden. Unter den Milzzellen finden sich $18,7 \pm 10,2$ % MIC-positiver Zellen bei den transgenen Mäusen gegenüber $3,2 \pm 6,1$ % unspezifisch gefärbter Zellen bei den Wildtypkontrollen. Im Thymus gibt es bei den transgenen Tieren $50,1 \pm 14,1$ % positive Zellen gegenüber $2,9 \pm 3,0$ % bei den Kontrolltieren. Es konnte also gezeigt werden, dass in den MIC3-transgenen Mäusen mindestens 10-20 % der Milzzellen und ca. 50 % der Thymuszellen das MIC3-Transgen an der Zelloberfläche exprimieren.

4.3.3 Untersuchung der MIC-Expression im Testis der MIC-transgenen Mäuse

Um die starke MIC-Expression auf RNA-Ebene im Testis bei den MIC-transgenen Mäusen näher zu untersuchen, wurden zunächst parallel von zwei Tieren im Alter von 21 Tagen, wenn die Meiose in größerem Umfang einsetzt, und drei 1 ½, 3 bzw. 4 Monate alten Tieren die Testes entnommen und daraus RNA präpariert. In einer vergleichenden Northernblot-Untersuchung zeigt sich, dass auch bei den 21 Tage alten Tieren eine MIC-Expression vorhanden ist und dass diese Expression nicht schwächer ist als bei adulten Tieren (Abb. 16a). Daraus lässt sich schließen, dass prämeiotische und u.U. somatische Zellen des Testis MIC exprimieren.

Um den MIC-exprimierenden Zelltyp im Testis näher zu charakterisieren, wurden von MIC3-9-Mäusen Sertoli-Zellen aus dem Testis gewonnen (siehe 3.13.6). In diesen Sertoli-Zellen konnte mittels Northernblot die MIC-Expression auf RNA-Ebene gezeigt werden (Abb. 16b).

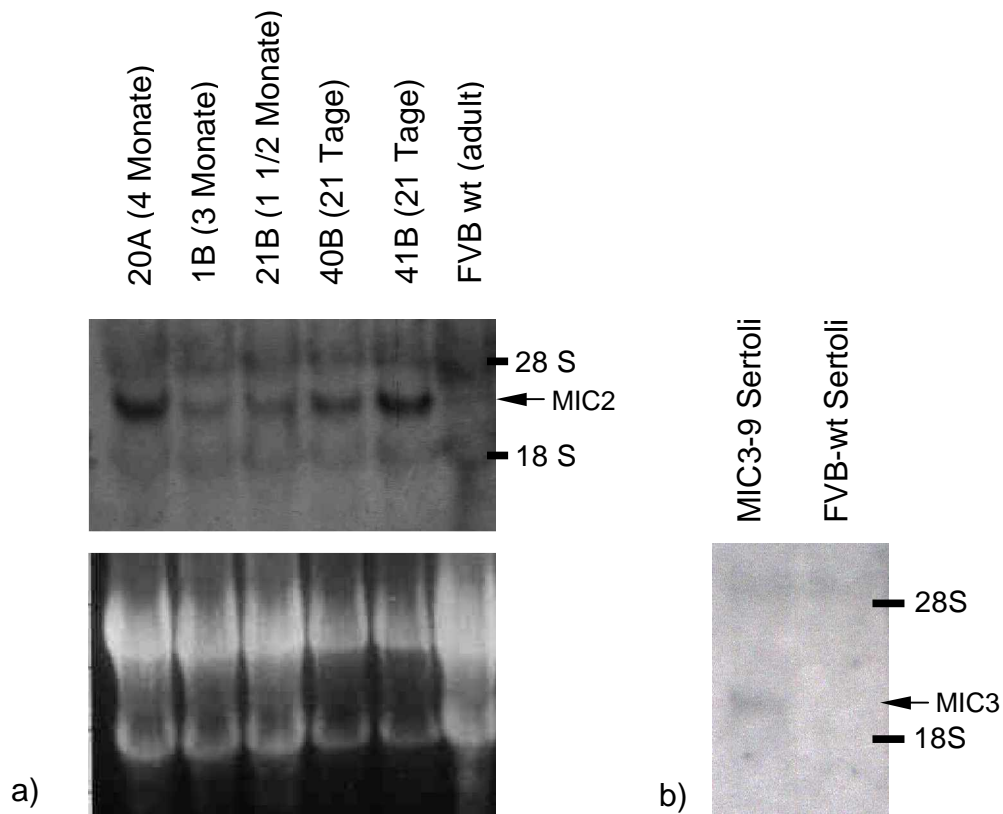


Abb. 16: Northernblot-Analyse der MIC-Expression in Testiszellen von MIC-transgenen Mäusen mit Hybridisierungssonde 1

a) Testis von MIC2-transgenen Mäusen

Über den Spuren ist die Bezeichnung der Individuen und ihr Alter angegeben. Die MIC2-hybridisierende Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind angezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist das Ethidiumbromidbild des RNA-Gels gezeigt.

b) Sertolizellen einer MIC3-transgenen Maus und einer FVB-Wildtypkontrolle

Die MIC3-hybridisierende Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Positionen der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind angezeigt.

4.3.4 Anti-MIC3-Antiseren

Um ein MIC-Antiserum zu erhalten, wurden Zellen der MIC3-exprimierenden L-Zellklons K43 in C3H-Mäuse injiziert, aus denen die L-Zelllinie nach Literaturdaten ursprünglich stammt. Daher bestand die Hoffnung, dass das Immunsystem der C3H-Mäuse lediglich auf das fremde MIC-Molekül mit der Bildung von MIC-spezifischen Antikörpern reagiert. Jedoch zeigte sich nach dreimaliger Immunisation mit je 10×10^6 Zellen trotz des angeblich syngenen Ursprungs der Zellen eine starke Reaktion des Antiserums, als Anti-MIC3-

Antiserum (C3H) bezeichnet, auch gegen die untransfizierte L-Zellen (Abb. 17). Die Reaktion mit den MIC-Transfektanten war aber deutlich stärker (Verschiebung der mittleren Fluoreszenz von ca. 70 auf 470 in Abb. 17 **A** gegenüber **B**).

Die Verfügbarkeit von MIC-transgenen Mäusen eröffnete eine neue Möglichkeit, MIC-Antisera zu erhalten, indem MIC-exprimierende Milz- und Thymuszellen der MIC3-9-transgenen FVB-Maus in wt-FVB-Mäuse injiziert werden (siehe 3.21). Deren Serum zeigt bereits nach der zweiten Injektion und in Verdünnung bis 1:500 eine starke Reaktion gegen die MIC3-L-Transfektante K43, jedoch nicht gegen untransfizierte L-Zellen (Abb. 17, **C** und **D**). Außerdem reagiert das Anti-MIC3-Antiserum in der Durchflußzytometrie auch mit Milz- und Thymuszellen der MIC3-9-Linie, jedoch nicht mit denen von wt-Mäusen (s.o. Abb. 15). Das auf diese Weise erzeugte Reagenz, als Anti-MIC3-Antiserum (FVB) bezeichnet, ist also spezifisch für das MIC3-Molekül.

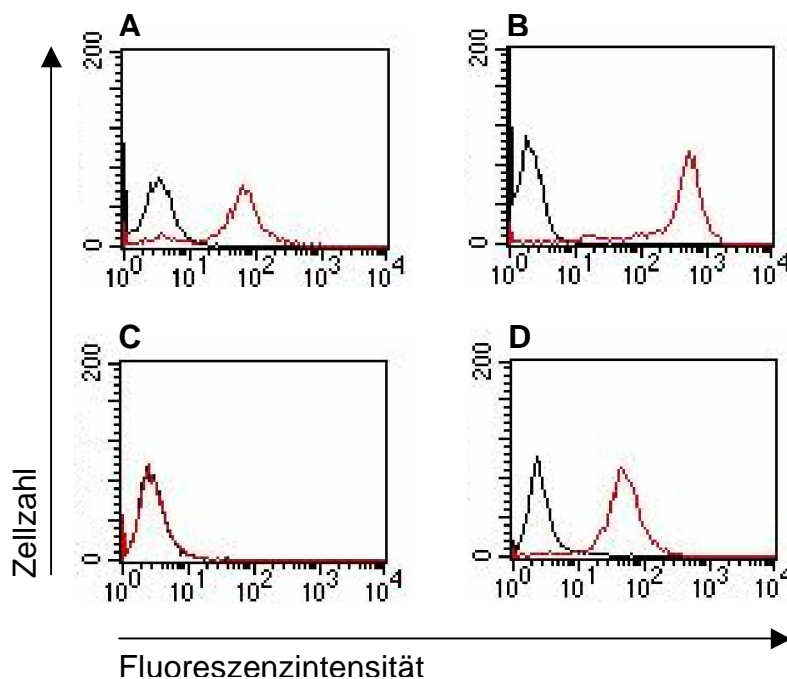


Abb. 17: Durchflußzytometrische Analyse der Reaktion der beiden etablierten Arten von Anti-MIC3-Antisera mit transfizierten und untransfizierten L-Zellen

Es wurde das Anti-MIC3-Antiserum (C3H) gegen untransfizierte L-Zellen (**A**) und den MIC3-exprimierenden L-Zellklon K43 (**B**) sowie das Anti-MIC3-Antiserum (FVB) gegen untransfizierte L-Zellen (**C**) und den MIC3-exprimierenden L-Zellklon K43 (**D**) eingesetzt.

Schwarz = Färbung der Zellen mit dem jeweiligen Nullserum; Rot = Färbung der Zellen mit dem jeweiligen Anti-MIC3-Antiserum

4.3.5 Versuch der Etablierung eines monoklonalen Anti-MIC-Antikörpers

Zur Etablierung von monoklonalen Anti-MIC-Antikörpern wurden Milzzellen von MIC-immunisierten FVB-Mäusen, in deren Serum MIC-Antikörper induziert worden waren, mit Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (653) fusioniert (siehe 3.22). Die Zellen wurden nach der Fusion unter annähernd klonalen Bedingungen auf 96-Well-Platten ausgesät, und durch die Verwendung von HAT-Medium wurde sichergestellt, dass nur fusionierte Zellen überlebten. Wenn sich die Hybridomzellen genügend vermehrt hatten, wurde der Mediumüberstand im Durchflußzytometer auf Reaktion gegen die MIC-transfizierte L-Zelllinie K43 getestet. Auf diese Weise wurden aus 8 Fusionen insgesamt etwa 1500 Klone getestet. Leider konnte dabei bisher noch kein Überstand identifiziert werden, der einen MIC-spezifischen Antikörper enthielt.

4.4 Analyse der MIC-Expression nach Hitzeschock

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich im Promotorbereich der menschlichen MICA- und MICB-Gene Hitzeschockelemente ähnlich denen von HSP70 finden und sich die MIC-Expression in der Zelllinie HeLa durch Hitzeschock erhöhen lässt (GROH et al., 1996). Da die Sequenzen der für die Transfektion und Etablierung der transgenen Mäuse verwendeten Cosmide H17173 (MIC2) und A158 (MIC3) von Prof. Hidetoshi Inoko (Tokai University, Isehara, Japan) ermittelt und zur Verfügung gestellt wurden, konnten diese Rhesusaffen-MIC-Sequenzen mit den humanen MICA- und MICB-Promotoren verglichen und auf das Vorhandensein solcher Hitzeschockelemente untersucht werden. Dabei fanden sich im Bereich des Promotors sowohl von MIC2 als auch von MIC3 die in der Literatur bei MICA und MICB beschriebenen Hitzeschockelemente (Abb. 18).

HSP70	GGAGGCGAAACCC	CTGGAATATTCCCG	ACCTGGCA
MICA	--TCT-C-GC--A	-----T---T-T	T--AA--G
MICB	--TCT-C-GG--G	--A-----T---T-T	T-TGAA-G
MIC2	A-TCT-C-GC--A	-----T---T-T	T--GA--G
MIC3	--TCT-C-GC--A	-----GT---T-T	T--GA--G

Abb. 18: Sequenzvergleich der Promotoren des humanen HSP70, MICA und MICB mit MIC2 und MIC3 des Rhesusaffen

Das Konsensus-Hitzeschockelement des HSP70 ist umrahmt und stimmt weitgehend mit Bereichen im Promotor von MIC1 und MIC2 überein (Abbildung nach GROH et al. (1996) erweitert um MIC2 und MIC3). Die Striche stehen dabei für Übereinstimmungen mit der HSP70-Sequenz.

Daher sollte untersucht werden, ob diese Elemente auch bei den MIC-Genen des Rhesusaffen eine Erhöhung der Expression durch Hitzeschock bewirken. Dazu wurden der MIC3-exprimierende L-Zell-Klon K43 sowie die Rhesusaffen-B-Zelllinie 1641 und die humane Zelllinie Ge einem Hitzeschock von 42°C für eine Stunde ausgesetzt, mit anschließender Erholung bei 37°C für vier Stunden. Eine mögliche Erhöhung der MIC-Expression sollte in diesem Versuch durch Nachweis des MIC-Moleküls auf der Zelloberfläche anhand des Anti-MIC-Antiserums (FVB) im Durchflußzytometer nachgewiesen werden. Die Effizienz des Hitzeschocks sollte durch den Nachweis des Hitzeschockproteins HSP70 mit dem spezifischen Antikörper RPN 1197 sowie dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus) und einem Peroxidase gekoppelten Tertiärantikörper im Westernblot überprüft werden. Es konnte in allen Zelllinien und transfizierten Zellen eine Zunahme des HSP70 nach dem Hitzschock gezeigt (Abb. 19) und damit die erwartete Hitzeschockwirkung nachgewiesen werden.

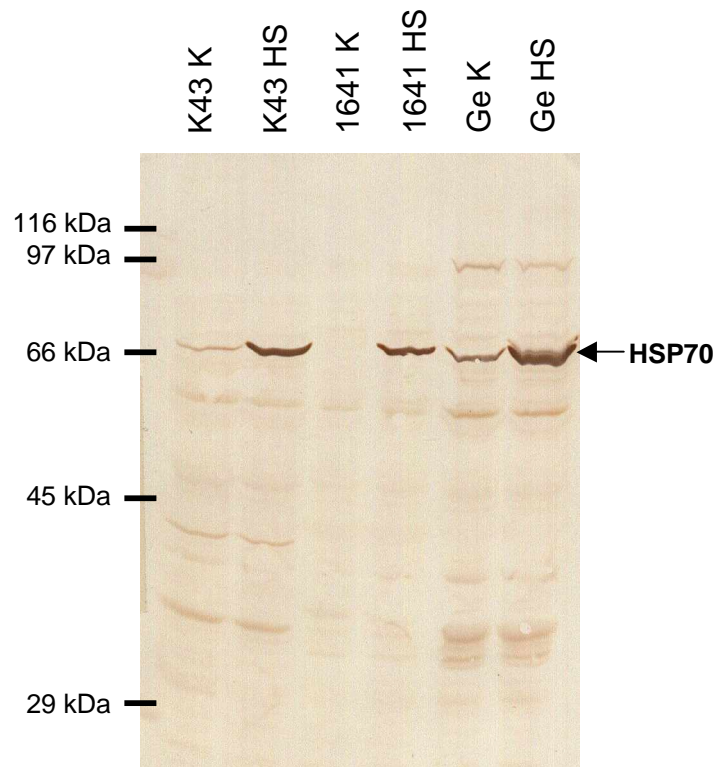


Abb. 19: Immunoblot-Analyse der HSP70-Expression in den Zelllinien 1641 und Ge sowie dem MIC3-transfizierten L-Zellklon K43 vor und nach einem Hitzeschock unter Verwendung des HSP70-spezifischen Antikörpers RPN 1197. Die menschliche Ge-Linie diente als Kontrolle.

Der Effekt des Hitzeschocks auf die Expression des MIC3-Moleküls wurde im Durchflußzytometer anhand der mittleren Fluoreszenz der Zellen verglichen. Die Fluoreszenz ist proportional zu der Menge der gebundenen MIC-Antikörper und somit zu der Menge der MIC-Moleküle an der Zelloberfläche. Bei dem MIC3-exprimierenden Klon K43 stieg die mittlere Fluoreszenz von 103,8 auf 113,6 und zeigte damit keine deutliche Zunahme. Bei der B-Zelllinie des Rhesusaffen 1641 sank sie von 11,92 auf 11,60. Auf der menschlichen Zelllinie Ge lässt sich mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) keine MIC-Expression nachweisen (Abb. 20).

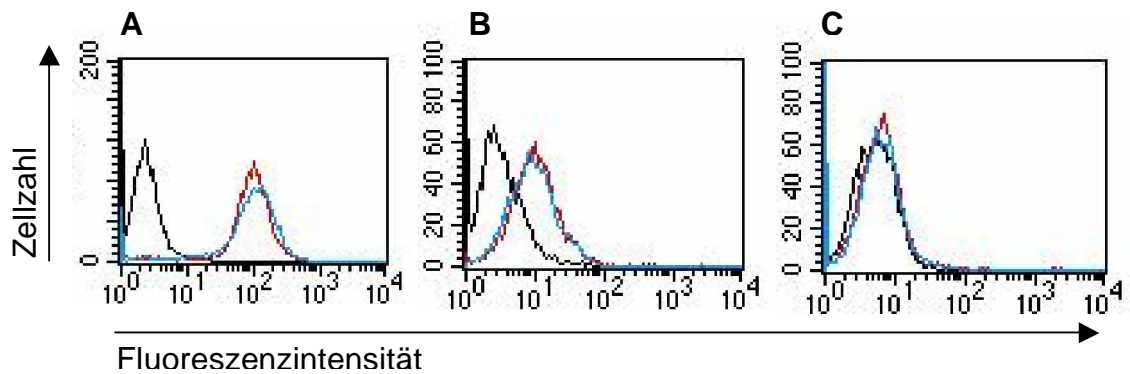


Abb. 20: Durchflußzytometrischer Nachweis der MIC-Zelloberflächenexpression der MIC3-Transfektante K43 (A) und der Zelllinien 1641 (B) und Ge (C) durch Inkubation mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB)
 Schwarz = Sekundärantikörper.
 Rot = Anti-MIC-Antiserum (FVB) und Sekundärantikörper vor dem Hitzeschock.
 Blau = Anti-MIC-Antiserum (FVB) und Sekundärantikörper nach dem Hitzeschock.

Dieser Versuch wurde abgewandelt wiederholt, wobei eine mögliche Zunahme der MIC-Expression über eine Zunahme der Lysierbarkeit der Zellen in einem Chromfreisetzungstest und parallel mit einer Northernblot-Analyse nachgewiesen werden sollte.

Die Zellen der MIC3 exprimierenden L-Klone K33 und K43 sowie untransfizierte L-Zellen und HeLa-Zellen wurden geerntet und in E+H-Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Die Ansätze wurden halbiert und jeweils die eine Hälfte einem Hitzeschock von 42°C für eine Stunde ausgesetzt, während die andere Hälfte bei 37°C gehalten wurde. Dann wurden die Ansätze erneut halbiert, wobei die eine Hälfte der L-, K43- und K33-Zellen in einem Chromfreisetzungstest eingesetzt und aus der anderen Hälfte die RNA für eine Northernblot-Analyse präpariert werden sollte. Aus den HeLa-Zellen wurde nur die RNA präpariert. Nach einer Ruhephase von drei Stunden wurden die Zellen chromiert (siehe 3.15) und nach einer weiteren Stunde wurden die chromierten Zellen in einem Chromfreisetzungstest mit menschlichen LAK-Zellen als Killerzellen eingesetzt. Bei der Auswertung des Chromfreisetzungstests ergab sich bei einem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen von 150 zu 1 für den Klon K43 eine spezifische Lyse von $54,7 \pm 4,5$ % bei der Kontrolle und $54,7 \pm 5,2$ % für die hitzegeschockten Zellen. Bei den K33-Zellen lag die spezifische Lyse der Kontrollzellen bei $38,2 \pm 1,0$ % und der hitzegeschockten Zellen bei $36,0 \pm 2,1$ %. Bei den untransfizierten L-Zellen betrug die spezifische Lyse der

Kontrollzellen $1,1 \pm 1,4$ % und die der hitzegeschockten Zellen $3,0 \pm 0,9$ % (Abb. 21). Bei der Lysierbarkeit der MIC3-exprimierenden Zielzellen durch die menschlichen LAK-Zellen zeigt sich also kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den hitzegeschockten Zellen.

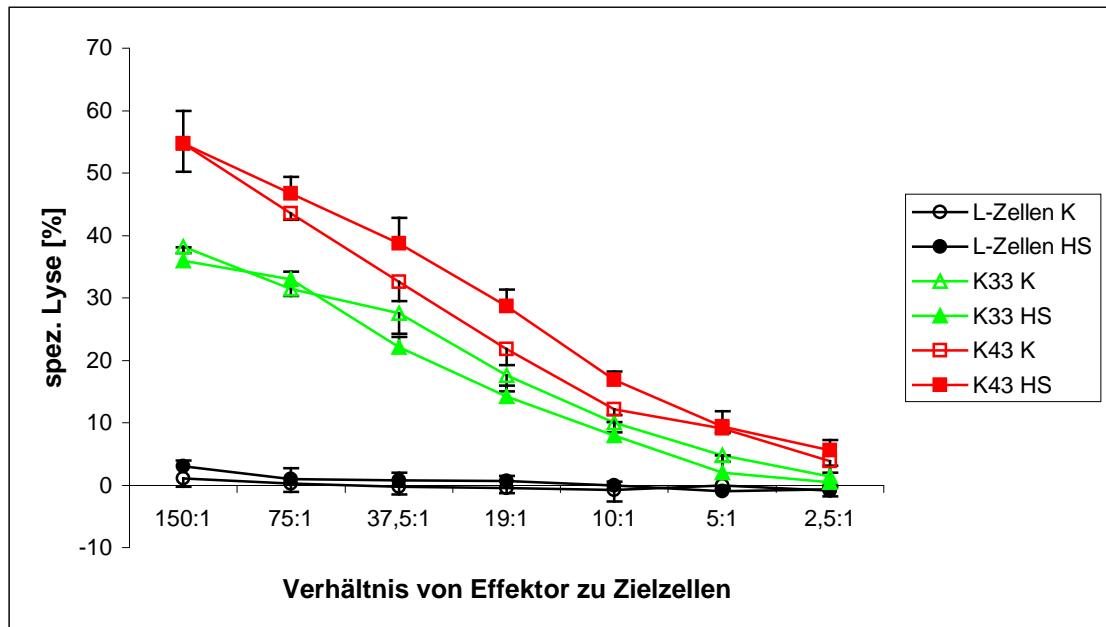


Abb. 21: Chromfreisetzungstest mit humanen LAK-Zellen als Effektorzellen
Als Zielzellen dienen hitzegeschockte sowie unbehandelte Zellen der L-Zelllinie sowie der MIC3-transfizierte L-Zellklone K43 und K33.

Aus den für die Northernblot-Analyse vorgesehenen Zellen wurde nach der Erholungsphase die RNA präpariert. Nach der Gelaufftrennung und dem Blotting wurde diese RNA mit der Hybridisierungssonde 1 (MIC1*01 Exon 4) hybridisiert.

Der Northernblot wurde nach der Hybridisierung unter nicht stringenten Bedingungen gewaschen (60°C ; $2\times\text{SSC}$; $0,1\%$ SDS) und der Röntgenfilm für zwei Tage exponiert. Nach dem Entwickeln zeigte sich, dass die Stärke des Hybridisierungssignals bei allen drei getesteten Zelllinien nach Hitzeschock gegenüber der Kontrolle nicht deutlich verändert war (Abb. 22).

Dieses Ergebnis steht zumindest im Falle der HeLa-Zellen im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Befunden (GROH et al., 1996). In den dort beschriebenen Versuchen stieg die Expression von MICA und MICB nach dem Hitzeschock deutlich an.

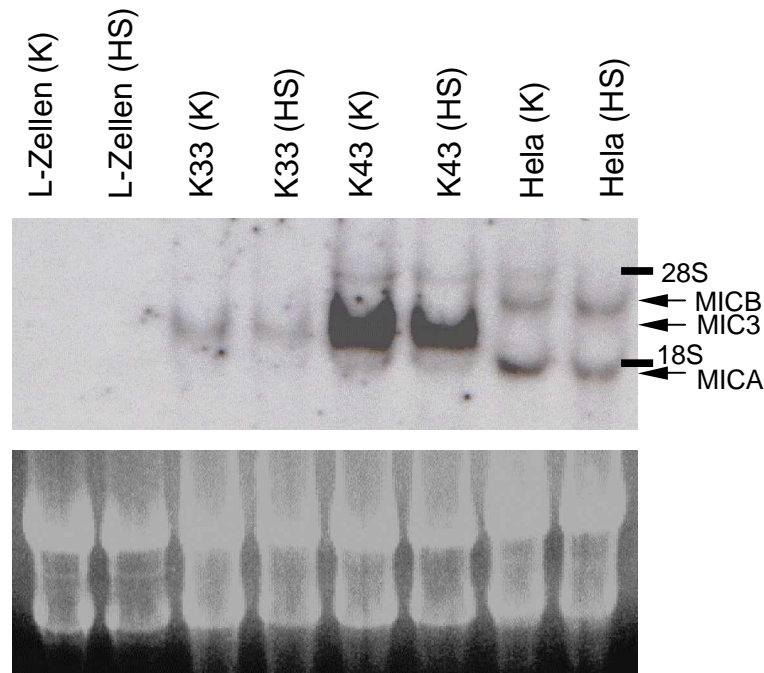


Abb. 22: Northernblot-Analyse der MIC-Expression verschiedener Zellen vor (K) und nach (HS) einem Hitzeschock

Der Nachweis der MIC-RNA erfolgte durch Hybridisierung mit der Hybridisierungssonde 1. Die Pfeile deuten auf die MIC3- bzw. MICA- und MICB-hybridisierenden Banden. Die Banden der 18S- und 28S-rRNA-Banden sind eingezeichnet.

Im unteren Teil der Abbildung ist das Ethidiumbromidbild des RNA-Gels zum Vergleich der RNA-Mengen gezeigt.

Neben den Zelllinien wurden auch die MIC-exprimierenden Milz- und Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus zur Analyse eines Hitzeschockeffekts herangezogen. Dazu wurde einer MIC3-transgenen Maus Milz und Thymus entnommen und zu Einzelsuspensionen homogenisiert, welche anschließend für eine Stunde einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt wurden. Zu Kontrollzwecken wurden parallel Zellen der Zelllinie HeLa und der Rhesusaffen-B-Zelllinie 1641 mitgeführt. Nach dem Hitzeschock wurde bei den Zellen nach einer bzw. zwei Stunden Erholung die MIC-Expression unter Verwendung des Anti-MIC-Antiserums (FVB) im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 23). Der Übersichtlichkeit halber sind die ermittelten Werte für die mittleren Fluoreszenzen in der Tabelle 6 zusammengefaßt. Auch in dieser Messung zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Fluoreszenz vor und nach dem Hitzeschock.

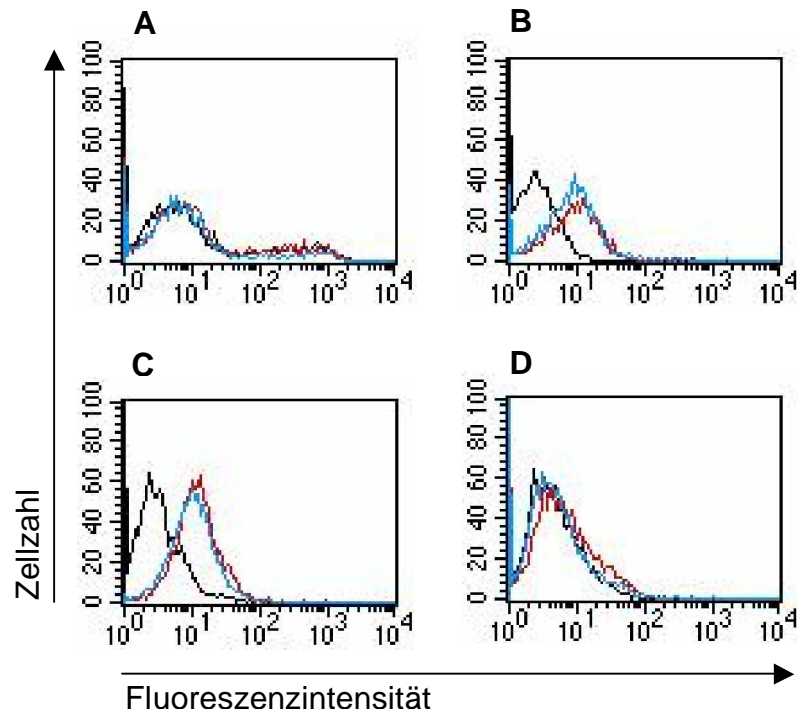


Abb. 23: Durchflußzytometrischer Nachweis der MIC-Zelloberflächenexpression auf Milzzellen (A) und Thymuszellen (B) einer MIC3-transgenen Maus sowie den Zelllinien 1641 (C) und HeLa (D) durch das Anti-MIC-Antiserum (FVB) vor und nach einem Hitzeschock von 42°C für eine Stunde und zwei Stunden Erholung. Schwarz = Sekundärantikörper. Rot = Anti-MIC-Antiserum (FVB) und Sekundärantikörper vor dem Hitzeschock. Blau = Anti-MIC-Antiserum (FVB) und Sekundärantikörper nach dem Hitzeschock.

Tab. 6: Darstellung der im Durchflußzytometer gemessenen Änderung der mittleren Fluoreszenz von verschiedenen mit Anti-MIC-Antiserum (FVB) inkubierter Zellen vor und nach einem Hitzeschock von 42°C für eine Stunde.

Zellen	Mittlere Fluoreszenz vor HS	Mittlere Fluoreszenz nach HS und 1 h Erholung	Mittlere Fluoreszenz nach HS und 2 h Erholung
Milzzellen	64,8	41,2	46,3
Thymuszellen	11,5	12,4	10,9
Rhesusaffen B-Zellen 1641	14,1	11,1	11,9
HeLa-Zellen	9,3	5,9	6,8

4.5 Auftreten von Anti-MIC-Antikörpern im Serum von FVB-Wildtypmäusen nach Verpaarung mit MIC-transgenen Männchen

Als Kontrolle zu den in dieser Arbeit verwendeten Anti-MIC-Antiseren (FVB) wurde bei durchflußzytometrischen Messungen und bei immunhistologischen Färbungen das Serum von nicht immunisierten FVB-Wildtypmäusen verwendet. Um sicherzugehen, dass dieses Nullserum tatsächlich keine Antikörper enthält, die mit dem MIC-Molekül reagieren, wurde es jeweils parallel auf untransfizierten L-Zellen und der MIC3-L-Zell-Transfektante K43 im Durchflußzytometer getestet. Überraschenderweise zeigte sich bei einem dieser Tests eine Reaktion des Nullserums mit dem Klon K43, nicht jedoch den untransfizierten L-Zellen. Da auch Seren von zur Verpaarung benutzten Wildtypmäusen eingesetzt worden waren, wurde überprüft ob die Verpaarung eines FVB-Wildtypweibchens mit einem MIC3-transgenen Männchen zur Bildung von Anti-MIC-Antikörpern im Serum des Weibchens führt. Dazu wurden vier FVB-Weibchen mit MIC3-transgenen Männchen verpaart. Vor der Verpaarung wurde von allen FVB-Weibchen Serum gewonnen und getestet. Dabei fanden sich bei keinem dieser Tiere MIC-Antikörper. Sechszwanzig Tage nachdem die Verpaarungen angesetzt worden sind, wurde von den Weibchen erneut Serum gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere 18A, 22D und 33D bereits geworfen, während das Weibchen 19A noch tragend war. Die Überprüfung der Seren mit einer Verdünnung von 1:50 im Durchflußzytometer zeigte, dass alle vier Tiere MIC-spezifische Antikörper gebildet hatten (Abb. 24). Mit untransfizierten L-Zellen waren alle Seren negativ.

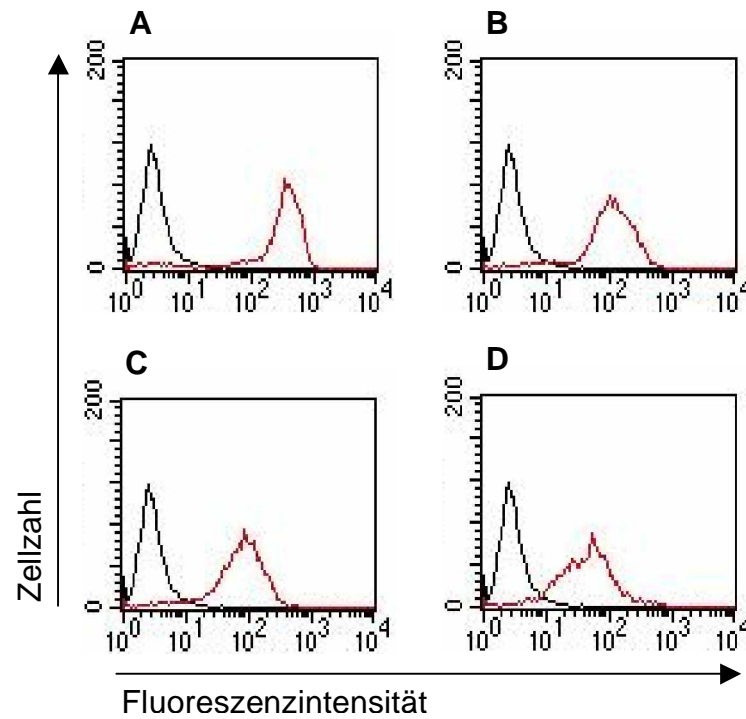


Abb. 24: Durchflußzytometrischer Test der Seren (1:50 verdünnt) von weiblichen wt-FVB-Mäusen, die mit MIC3-transgenen männlichen FVB-Mäusen verpaart worden waren

Die Tiere 18A (A), 22D (B) und 33D (C) hatten bereits geworfen, das Tier 19A (D) war noch tragend. Der Test erfolgte gegen den MIC3-transfizierte L-Zellklon K43

Schwarz = ungefärbte Zellen

Rot = Serum der Mäuse und Sekundärantikörper

5. Diskussion

Da bereits vorangegangene Untersuchungen an Rhesusaffen gezeigt hatten, dass offenbar nicht immer alle drei exprimierbaren MIC-Gene im Genom vorhanden sein müssen (SEO et al., 1999; 2001), sollte zunächst dieser Aspekt eingehender untersucht werden. Im Laufe der Arbeit ergab sich die Möglichkeit, die DNA von insgesamt 45 Rhesusaffen mittels einer für MIC1-, MIC2- und MIC3-spezifischen PCR auf die Anwesenheit der drei Gene zu untersuchen. Es zeigte sich, dass nur 15 der 45 untersuchten Rhesusaffen alle drei MIC-Gene besaßen. Bei 12 untersuchten Tieren fehlte eines der MIC-Gene und bei 18 Affen sogar zwei. Es fand sich jedoch kein Rhesusaffe, der überhaupt keine MIC-Gene aufwies. Das am häufigsten auftretende MIC-Gen in der untersuchten Gruppe ist MIC3, das bei 93% der untersuchten Rhesusaffen zu finden war. Die Verteilung von MIC1 mit 53% und MIC2 von 47% ist etwa ausgeglichen. Entsprechend dem häufigen Auftreten von MIC3 findet sich dieses Gen auch bei 17 der 18 Rhesusaffen, die nur ein MIC-Gen besitzen. Nur in einem Tier konnte allein das MIC1-Gen nachgewiesen werden.

Da das Fehlen von einem oder sogar zwei MIC-Genen im Rhesusaffen ziemlich häufig auftritt, scheint es nicht von entscheidender Bedeutung zu sein, alle drei exprimierbaren MIC-Gene zu besitzen. Das deckt sich mit Untersuchungen beim Menschen, die gezeigt haben, dass viele Individuen auch nur ein funktionelles MIC-Gen, MICA oder MICB, besitzen, ohne dass daraus Nachteile offensichtlich werden. So gibt es z.B. in der kaukasischen Population eine weit verbreitete Frameshift-Mutation des MICA*008-Allels, MICA*008/5.1. Bei dieser Mutation kommt es durch ein zusätzliches Nukleotid in der transmembranen Region zu einem vorzeitigen Stop-Kodon in diesem Bereich, was dazu führt, dass ein zytoplasmatisches Sortierungssignal fehlt und dieses MIC-Molekül nicht wie normalerweise an der basolateralen sondern an der apikalen Zelloberfläche von Darmepithelzellen präsentiert wird (SUEMIZU et al., 2002).

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersuchen, ob unter denjenigen Rhesusaffen, die nur ein MIC-Gen besitzen, Individuen vorkommen, bei denen dieses MIC-Gen durch eine Mutation defekt ist. Untersuchungen an solchen Tieren könnten sicherlich weiteren Aufschluss über die Bedeutung der MIC-Gene im Immunsystem geben.

Aufschlussreich war die Untersuchung der B-Zelllinie des Rhesusaffen 1641, die im Deutschen Primatenzentrum in Göttingen mit Epstein-Barr-Virus infiziert wurde, um sie zu immortalisieren und in Kultur halten zu können. In der Literatur ist bisher stets beschrieben worden, dass weder B-Zellen des Menschen noch die verschiedener nichtmenschlicher Primaten MIC-Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren (ZWIRNER et al., 1998, STEINLE et al., 1998). Überraschenderweise zeigten sich bei der Northernblot-Analyse mit der Zelllinie 1641 drei spezifische Banden auf der Höhe von ca. 2 kb, 2,5 kb und 2,8 kb, die den Genen MIC1, MIC2 und MIC3 entsprechen. Dieser Befund zeigt, dass in dieser Zelllinie MIC-Gene, und zwar alle drei, auf RNA-Ebene exprimiert werden. Dies konnte durch eine RT-PCR-Analyse bestätigt werden, in der cDNA-Klone von diesen drei MIC-Genen identifiziert werden konnten. Um diesen Befund auch auf die Proteinebene auszuweiten, wurden die Zellen dieser B-Zelllinie mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) inkubiert und im Durchflußzytometer gemessen. Die dabei gemessene, wenn auch geringe, Zunahme der mittleren Fluoreszenz der Zellen von 6,0 bei der Kontrollfärbung mit dem Nullserum zu 14,6 nach der Reaktion mit dem Anti-MIC-Antiserum (FVB) zeigt, dass zumindest eines der MIC-Moleküle auch an die Zelloberfläche transportiert wird. Da jedoch zur Zeit für den Rhesusaffen keine Antikörper existieren, die spezifisch zwischen diesen drei MIC-Genen diskriminieren können, lässt sich nicht feststellen, welches dieser drei MIC-Moleküle tatsächlich an der Zelloberfläche dieser B-Zelllinie vorhanden ist. Auch lässt sich nicht sagen, ob die recht schwache Zunahme der Fluoreszenz an einer geringen MIC-Expression oder einer schwachen Affinität des Anti-MIC-Antiserums (FVB) liegt. Immerhin ist es bemerkenswert, dass die MIC-Gene in dieser B-Zelllinie überhaupt exprimiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Epstein-Barr-Virus-Infektion sein. In der Literatur wurde auch für andere Zellen beschrieben, dass die MIC-Expression nach einer viralen Infektion – in diesem Fall mit dem Cytomegalovirus (CMV) – induzierbar ist (GROH et al., 2001).

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Expression der MIC-Gene im Rhesusaffen. Aus verschiedenen Arbeiten über die MIC-Gene

beim Menschen ist bekannt, dass die Expression auf bestimmte Gewebe und Zelltypen beschränkt ist. Dabei herrscht Einigkeit über die MIC-Expression im Darmepithel und in verschiedenen epithelialen Tumoren (GROH et al., 1998, GROH et al., 1999). Jedoch wird die Expression in Organen wie der Niere oder in Zellen wie Monozyten bisher noch kontrovers diskutiert (LEELAYUVAT et al., 1996, ZWIRNER et al., 1998). Für den Rhesusaffen gab es bisher keine systematischen Untersuchungen zur MIC-Expression.

Zunächst wurde daher eine Reihe von Organen eines weiblichen Rhesusaffen (1801) sowie der Testis eines männlichen Tieres (6442) in einer Northernblot-Analyse auf das Vorhandensein von MIC-RNA untersucht. Diese Untersuchung ergab eine starke MIC-Expression im Testis des männlichen Tieres sowie deutlich schwächere Signale in Milz, Dickdarm, Dünndarm und Magen des weiblichen Tieres. Da diese Signale jedoch so schwach waren, dass sie selbst nach einer fünftägigen Exposition des Röntgenfilms kaum zu erkennen waren, wurde die Expression der MIC-Gene auf der RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Dabei ergab sich eine MIC-Expression in allen getesteten Organen, d.h. in Testis, Ovar, Dünndarm, Dickdarm, Magen, Niere, Leber, Lunge, Haut, Herz, Muskel, Lymphknoten und Milz. Da der weibliche Rhesusaffe 1801 nur das MIC3-Gen trägt, gelten diese Expressionsbefunde nur für dieses der drei MIC-Gene.

Mit einer für MIC1, MIC2 und MIC3 spezifischen RT-PCR konnte bei dem männlichen Rhesusaffen 6442 die Expression aller drei MIC-Gene im Testis auf der RNA-Ebene gezeigt werden. Damit ist bewiesen, dass nicht nur in der EBV-transfizierten B-Zelllinie, sondern auch in normalem Gewebe eines Rhesusaffen alle drei MIC-Gene gleichzeitig exprimiert sein können, was bisher noch nicht gezeigt wurde.

Zur Analyse der MIC-Expression auf der Proteinebene wurden unter Verwendung von Anti-MIC-Antiseren (FVB) immunhistologische Untersuchungen an Paraffinschnitten einer Vielzahl von Geweben von zwei männlichen Rhesusaffen durchgeführt. Bei einem Affen (6197) handelte es sich um ein Tier, das ein Jahr vor seinem Tod experimentell mit SIV infiziert worden war und das bei der Sektion eine chronische Darmentzündung aufwies. Der andere Rhesusaffe (6283) war ein nicht mit SIV infiziertes Kontrolltier, das auch keine Darmentzündung zeigte. Mit Hilfe des Anti-MIC-Antiserums (FVB) konnte

bei beiden Tieren lediglich eine MIC-Expression in den Epithelzellen des Dünndarms nachgewiesen werden. Selbst im Testis, der bei den RNA-Untersuchungen die stärkste MIC-Expression zeigte, ließ sich keine MIC-Expression auf der Proteinebene zeigen, so dass das Auftreten großer Mengen von MIC-RNA im Testis nicht mit entsprechender Proteinexpression einhergeht. Beim Vergleich der MIC-Expression im Dünndarm der beiden Affen fällt auf, dass bei dem Kontrolltier nicht alle Epithelzellen gefärbt sind. Bei diesem Tier scheint sich die MIC-Expression eher auf den Bereich der Krypten zu konzentrieren. Bei dem SIV-infizierten Affen mit der Enteritis hingegen sind die Epithelzellen durchgehend gefärbt. Dieses Ergebnis liess sich in einer zweiten Färbung von Paraffinschnitten des Dünndarms dieser Tiere bestätigen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass nur für das SIV-infizierte Tier der MIC-Genotyp – Vorhandensein aller drei MIC-Gene – ermittelt werden konnte, aber nicht für das Kontrolltier. Es ist wünschenswert, Zugang zu Paraffinschnitten von weiteren genotypisierten Rhesusaffen zu bekommen, um das erhaltene Ergebnisse abzusichern. Dieser Befund könnte bedeuten, dass durch die chronische Entzündungsreaktion die MIC-Expression in den Epithelzellen hochreguliert wird. Dieser Befund stände im Einklang mit der für die MIC-Gene des Menschen beschriebene Induzierbarkeit durch Stress bzw. Virusinfektionen (GROH et al., 1996; 1998).

Um die am Rhesusaffen eingeschränkten experimentellen Möglichkeiten zu kompensieren, wurden MIC-exprimierende Mauszellen erzeugt. Die Mausepezies bot sich an, weil Mäuse selber keine MIC-Gene besitzen (BAHRAM et al., 1994). Aus diesem Grund kann man die untransfizierten Zellen in funktionellen Versuchen als Negativkontrolle verwenden, ohne dass ein endogenes MIC-Molekül stören würde. Des weiteren können MIC-spezifische Antiseren erhalten werden, wenn man die MIC-exprimierenden Mauszellen in den isogenen Ausgangsstamm injiziert. Das MIC3-Gen-tragenden Cosmid A158 wurde stabil in die Maus-L-Zelllinie transfiziert und MIC-exprimierende Klone, darunter K33 und K43 konnten etabliert werden. Interessanterweise erlaubt der MIC-Promotor, der im transfizierten Cosmid enthalten ist, die Expression in Mausfibroblasten.

Da die L-Zellen laut Literatur aus dem C3H-Inzuchtstamm der Maus stammen, wurden C3H-Mäuse mit der L-Zell-Transfektante K43 immunisiert, um Anti-MIC-Antiseren zu erzeugen. Dieses Experiment ergab jedoch nicht das gewünschte Ergebnis, da die auf diese Weise gewonnenen Anti-MIC3-Antiseren (C3H) nicht nur mit den MIC-exprimierenden L-Zellen reagierten, sondern, wenn auch schwächer, ebenfalls mit den untransfizierten Kontrollzellen. Offenbar weisen die Zellen der L-Zelllinie doch genotypische Unterschiede zur C3H-Maus auf, die zu einer Immunantwort führen. Dennoch gab die stärkere Reaktion des Serums gegen die MIC-exprimierenden L-Klone einen ersten Hinweis darauf, dass das MIC-Molekül auch an der Oberfläche dieser Zellen exprimiert wird. Dieser Befund konnte später durch die mit Hilfe der transgenen Maus erzeugten Anti-MIC-Antiseren (FVB) bestätigt werden. Der Weg, anhand von MIC-Transfektanten Anti-MIC-Antikörper zu erzeugen, wurde durch die Nutzung der transgenen Mausstämmen überflüssig, da im letzteren Ansatz hochtitrige und spezifische Anti-MIC-Antiseren (FVB) erhalten wurden.

Die L-Zell-Transfektanten ermöglichen es weiter zu untersuchen, ob das transgene MIC-Gen als Zielmolekül von NK-Zellen fungieren kann. Dazu wurden zunächst humane LAK-Zellen verwendet, da menschliches Blut leichter verfügbar ist als das von Rhesusaffen. Außerdem ist die Erkennung der MIC1- und MIC2-Moleküle des Rhesusaffen durch humane Killerzellen schon in der Literatur beschrieben worden (STEINLE et al., 1998). Beide Klone ließen sich lysieren, untransfizierte L-Zellen wurden hingegen nicht lysiert. Ein ähnliches Resultat ergab auch ein Chromfreisetzungstest mit LAK-Zellen von Rhesusaffen. Diese Versuche zeigen, dass die von der L-Zelllinie exprimierten MIC3-Moleküle des Rhesusaffen sowohl von LAK-Zellen des Menschen als auch des Rhesusaffen erkannt werden und zu einer Lyse der Zellen führen.

Nachdem sich MIC-Gene des Rhesusaffen in Mauszellen nach Cosmidtransfektion exprimieren ließen, wurde der erfolgreiche Versuch unternommen, für diese MIC2- bzw. MIC3-Cosmide transgene Mäuse zu etablieren. Nach der Untersuchung eines breiten Organspektrums dieser transgenen Mäuse in Northernblotanalysen zeigte sich, dass bei den MIC2-transgenen Mäusen das MIC-Gen lediglich im Testis exprimiert wird. Bei der MIC3-transgenen Linie hingegen konnte ebenfalls eine starke MIC-Expression

im Testis nachgewiesen werden, darüber hinaus zeigten sich im Northernblot aber auch schwache Banden in Leber, Milz, Dickdarm, Lunge und Thymus. Bei dieser MIC3-transgenen Mauslinie ergab sich demnach in der Northernblotanalyse eine ähnliche Expression wie im Testis, der Milz und dem Dickdarm des untersuchten Rhesusaffen, der nur das MIC3-Gen trägt. Die in der Maus nicht detektierte MIC-Expression in Dünndarm und Magen könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie dort unterhalb der Nachweisgrenze für diesen Test liegt, da auch die Northernblot-Banden beim Rhesusaffen nur äußerst schwach waren. Die MIC-Expression im Thymus hingegen konnte beim Rhesusaffen nicht untersucht werden, da dieses Gewebe nicht verfügbar war. Die entdeckten Ähnlichkeiten im Expressionsmuster zwischen der MIC3-transgenen Maus und dem Rhesusaffen könnten also darauf hindeuten, dass die Regulation der MIC-Expression in der MIC3-transgenen Maus der des Rhesusaffen entspricht. Die Ursache der abweichenden MIC2-Expression konnte nicht ermittelt werden. Eine Möglichkeit ist, dass das MIC2-Cosmid nicht den vollständigen Promotor enthält oder die Kopienzahl des MIC2-Transgens im Genom eine Rolle spielt und diese bei MIC3 höher ist. Ebenso wie beim Rhesusaffen lässt sich auch in der MIC3-transgenen Maus durch die empfindliche RT-PCR eine zumindest schwache MIC3-Expression in allen untersuchten Organen nachweisen, die aber auch hier in einigen Geweben trotz der Verwendung großer Mengen cDNA für den Reaktionsansatz nahe der Nachweisgrenze liegt.

Die Entdeckung der MIC-Expression in den Milz- und Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus eröffnete eine neue Möglichkeit, Anti-MIC-Antikörper zu erzeugen, indem FVB-Wildtypmäuse mit Milz- und Thymuszellen von MIC3-transgenen FVB-Mäusen immunisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die FVB-Mäuse auf die Injektion mit den MIC3-transgenen Milz- und Thymuszellen mit der Bildung von hochtitrigen MIC-Antikörpern reagierten, die mit den untransfizierten L-Zellen nicht reagierten. Trotz vieler durchgeführter Fusionen ist es unerklärlicherweise bisher nicht gelungen, unter den über 1500 erzeugten Hybridomen solche zu finden, die MIC-Antikörper produzieren.

Mit Hilfe solcher Antiseren konnte gezeigt werden, dass mindestens 10-20% der Milzzellen und 40-60% der Thymuszellen der MIC3-transgenen Mäuse das MIC3-Transgen auf der Oberfläche exprimieren. Die Milzwerte stellen dabei eher eine Unterschätzung dar, da aus methodischen Gründen der in der Durchflußzytometrie benutzte Anti-Immunglobulin-Antikörper mit den B-Lymphozyten reagiert. Diese Daten bestätigen, dass MIC-Gene auf Lymphozyten exprimiert werden können, wie oben bereits für die EBV-Linie besprochen wurde. Da die Transgene vom „eigenen“ Promotor kontrolliert werden, ist die Expression kein Artefakt durch einen fremden Promotor. Ob auch im Rhesusaffen eine derart starke MIC3-Expression in Milz und Thymus auftritt, ist noch nicht bekannt. Da der Thymus das zentrale Organ der Entwicklung der T-Lymphozyten und der immunologischen Toleranz ist, könnte die MIC-Expression im Thymus weiter untersuchenswert sein.

Überraschenderweise fand sich in den MIC-transgenen Mäusen eine starke Expression von MIC3 bzw. MIC2 im Testis. Dieser Befund war Anlaß, die MIC-Expression im Testis von Rhesusaffen zu überprüfen. Tatsächlich tritt hier auch eine starke MIC-Expression auf, und zwar in diesem Tier von MIC1, MIC2 und MIC3. Eine Testisexpression ist bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Detaillierte weitere Untersuchungen sind am Rhesusaffen aber wegen der schweren Zugänglichkeit des Materials limitiert.

Um den Zelltyp weiter einzugrenzen, bei dem es zu dieser starken Expression kommt, wurde die RNA von reifen und unreifen Testes MIC2-transgener Mäuse in einer Northernblotanalyse verglichen. Dabei zeigte sich, dass auch bei den 21 Tage alten Tieren bereits eine MIC2-Expression nachweisbar ist und dass keine Zunahme der MIC2-Expression in den adulten Tieren festzustellen war. Dieses Ergebnis schließt aus, dass die MIC-Expression wesentlich auf postmeiotische Keimzellen zurückgeht. Um zu bestätigen, dass das MIC3-Gen zumindest auch in den Somazellen des Testis exprimiert wird, wurden aus der MIC3-transgenen Maus isolierte Sertolizellen untersucht. Die Northernblot-Analyse ergab zwar eine MIC3-Expression, die jedoch nur sehr schwach war. Somit konnte eine MIC3-Expression in den Somazellen klar nachgewiesen werden, die Sertolizellen scheinen jedoch nicht für die im Testis nachgewiesene starke MIC3-Expression verantwortlich zu sein.

Da in der Literatur beschrieben wurde, dass sich im Promotorbereich der humanen MIC-Gene Hitzeschockelemente finden, die bewirken, dass bei HeLa-Zellen nach einem Hitzeschock die RNA-Expression von MICA und MICB stark ansteigt (GROH et al., 1996), wurden auch die MIC-Promotorregionen auf den Cosmiden H17173 (MIC2) und A158 (MIC3) auf das Vorhandensein von Hitzeschockelementen untersucht. Es finden sich fast die identischen für die menschlichen MICA- und MICB-Gene beschriebenen Hitzeschockelemente auch bei MIC2 und MIC3. In den Hitzeschockversuchen mit den MIC3-Transfektanten K33 und K43, sowie Milz- und Thymuszellen der MIC3-transgenen Maus und HeLa-Zellen, konnte auf RNA- und Proteinebene allerdings keine Zunahme der MIC-Expression festgestellt werden. Die Effizienz des Hitzeschocks konnte durch die Zunahme der HSP70-Expression im Westernblot gezeigt werden. In der Literatur ist die Zunahme der MIC-Expression nach Hitzeschock lediglich für die HeLa-Zellen beschrieben worden. Dass sich bei den in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen kein Hitzeschockeffekt zeigt, könnte u.U. an der Heterogenität der eingesetzten HeLa-Zelllinien liegen. Da die immunhistologischen Befunde an dem SIV-infizierten Rhesusaffen auf eine Stressinduzierbarkeit der Rhesusaffen-MIC-Gene hindeuten könnte, ist das Ergebnis der Hitzeschock-Versuche überraschend und zeigt, dass zumindest Hitzeschock als Stressor nicht zu MIC3-Expression in den untersuchten Zellen führt. Bei den verwendeten MIC-Transfektanten handelt es sich um artifizielle Systeme, die normalerweise überhaupt keine MIC-Moleküle exprimieren würden. Möglicherweise werden daher in diese Zellen die MIC-Gene bereits auf dem maximalen Niveau exprimiert und lassen sich nicht weiter induzieren.

Im Verlauf der Herstellung von Anti-MIC-Antiseren und der Nutzung von Kontrollseren in der Maus stellte sich heraus, dass Wildtypmäuse, die mit MIC3-transgenen Männchen verpaart worden waren, Anti-MIC-Antikörper bilden. Diese Antiseren sind ebenso hochtitrig und spezifisch wie die nach Immunisation mit MIC3-positiven Zellen erzeugten. Ob die Immunisation der Weibchen durch Spermien oder den Embryo erfolgt, ist offen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass beim Menschen eine Hauptquelle von

Anti-MHC-Klasse-I-Antikörpern Schwangerenseren gewesen sind und dass nach Transplantation MIC-Antikörper auftreten (ZWIRNER et al., 2000).

Die durchgeführten Untersuchungen erweitern unsere bisherige Kenntnis über die Expression von MIC-Genen im Rhesusaffen und führen anhand der MIC-transgenen Maus ein neues Untersuchungsmodell für MIC-Gene ein.

6. Literaturverzeichnis

- AHMAD T., MARSHALL S.E., MULCAHY-HAWES K., ORCHARD T., CRAWSHAW J., ARMUZZI A., NEVILLE M., VAN HEEL D., BARNARDO M., WELSH K.I., JEWELL D.P., BUNCE M., 2002: High resolution MIC genotyping: Design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens* 60: 164-179
- ALWINE J. C., KEMP D. J., STARK G.R., 1977: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354
- BAHRAM S., BRESNAHAN M., GERAGHTY D.E., SPIES T., 1994: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6259-6263
- BAUER S., GROH V., WU J., STEINLE A., PHILLIPS J.H., LANIER L.L., SPIES T., 1999: Activation of NK Cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729
- BJØRKMAN P.J., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BENNETT W.S., STROMINGER J.L., WILEY D.C., 1987a: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512
- BJØRKMAN P.J., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BENNETT W.S., STROMINGER J.L., WILEY D.C., 1987b: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518
- BROK H.P.M., BAUER J., JONKER M., BLEZER E., AMOR S., BONTROP R.E., LAMAN J.D., 't HART B.A., 2001: Non-human primate models of multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 183: 173-185

- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 152-159
- DOXIADIS G.G.M., OTTING N., DE GROOT N.G., BONTROP R.E., 2001: Differential evolutionary MHC class II strategies in humans and rhesus macaques: relevance for biomedical studies. *Immunol. Rev.* 183: 76-85
- FEINBERG A. P., VOGELSTEIN B., 1983: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13
- GAMBELUNGHE G., FALORNI A., GHADERI M., LAURETI S., TORTOIOLI C., SANTEUSANIO F., BRUNETTI P., SANJEEVI C.B., 1999: Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3701-3707
- GLAS J., MARTIN K., BRUNNLER G., KOPP R., FOLWACZNY C., WEISS E.H., ALBERT E.D., 2001: MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 58: 243-249
- GORDON J. W., SCANGOS G. A., PLOTKIN D. J., BARBOSA J. A., RUDDLE F. H., 1980 : Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384
- GORER P.A., 1936: The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Path.* 18: 31-36.
- GROH V., BAHRAM S., BAUER S., HERMAN A., BEAUCHAMP M., SPIES T., 1996: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12445-12450

- GROH V., STEINLE A., BAUER S., SPIES T., 1998: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279: 1737-1740
- GROH V., RHINEHART R., SECRIST H., BAUER S., GRABSTEIN K.H., SPIES T., 1999: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6879-6884
- GROH V., RHINEHART R., RANDOLPH-HABECKKER J., TOPP M.S., RIDDELL S.R., SPIES T., 2001: Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2: 255-260
- HANKEY K.G., DRACHENBERG C.B., PAPADIMITIOU J.C., KLASSEN D.K., PHILOSOPHE B., BARTLETT S.T., GROH V., SPIES T., MANN D.L., 2002: MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73: 304-306
- HUGHES A.L., YEAGER M., TEN ELSHOF A.E., CHORNEY M.J., 1999: A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol. Today* 20: 22-26
- KENT S.J., ADA G.L., HAYES E., LEWIS I.M., 2001: Determining the immune mechanisms of protection from AIDS: correlates of immunity and the development of syngeneic macaques. *Immunol. Rev.* 183: 94-108
- KNECHTLE S.J., HAMAWY M.M., HU H., FECHNER Jr. J.H., CHO C.S., 2001: Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol. Rev.* 183: 205-213
- KÖHLER G., MILSTEIN C., 1975: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497

- KOMATSU-WAKUI M., TOKUNAGA K., ISHIKAWA Y., KASHIWASE K., MORIYAMA S., TSUCHIYA N., ANDO H., SHIINA T., GERAGHTY D.E., INOKO H., JUJI T., 1999: MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* 49: 620-628
- KOMATSU-WAKUI M., TOKUNAGA K., ISHIKAWA Y., LEELAYUWAT C., KASHIWASE K., TANAKA H., MORIYAMA S., NAKAJIMA F., PARK M.H., JIA G.J., CHIMGE N.O., SIDELTSEVA E.W., JUJI T., 2001: Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens* 57: 1-8
- LAEMMLI U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LEELAYUWAT C., TOWNEND D.C., DEGLI-ESPOSTI M.A., ABRAHAM L.J., DAWKINS R.L., 1994: A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 40: 339-351
- LEELAYUWAT C., HOLLINGSWORTH P., PUMMER S., LERTMEMONGKOLCHAI G., THOM G., MULLBERG J, WITT C., KAUFMANN J., DEGLI-ESPOSTI M.A., COSMAN D., DAWKINS R., 1996: Antibody reactivity profiles following immunization with diverse peptides of the PERB11 (MIC) family. *Clin. Exp. Immunol.* 106: 568-76
- LI P., WILLIE S.T., BAUER S., MORRIS D.L., SPIES T., STRONG R.K., 1999: Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T cell ligand. *Immunity* 10: 577-584
- LI P., MORRIS D.L., WILLCOX B.E., STEINLE A., SPIES T., STRONG R.K., 2001: Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.* 2: 443-451

- MARTINEZ A., FERNANDEZ-ARQUERO M., Balsa A., RUBIO A., ALVES H., PASCUAL-SALCEDO D., MARTIN-MOLA E., DE LA CONCHA E.G., 2001: Primary association of a MICA allele with protection against rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44: 1261-1265
- MIZUKI N., OTA M., KIMURA M., OHNO S., ANDO H., KATSUYAMA Y., YAMAZAKI M., WATANABE K., GOTO K., NAKAMURA S., BAHARAM S., INOKO H., 1997: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1298-1303
- O'CONNOR D., FRIEDRICH T., HUGHES A., ALLEN T.M., WATKINS D., 2001: Understanding cytotoxic T-lymphocyte escape during simian immunodeficiency virus infection. *Immunol. Rev.* 183: 115-126
- ORCHARD T.R., DHAR A., SIMMONS J.D., VAUGHAN R., WELSH K.I., JEWELL D.P., 2001: MHC class I chain-like gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 126: 437-440
- PACHNER A.R., 2001: The rhesus model of Lyme neuroborreliosis. *Immunol. Rev.* 183: 186-204
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A., 1977: DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- SHIINA T., TAMIYA G., OKA A., TAKISHIMA N., YAMAGATA T., KIKKAWA E., IWATA K., TOMIZAWA M., OKUAKI N., KUWANO Y., WATANABE K., FUKUZUMI Y., ITAKURA S., SUGAWARA C., ONO A., YAMAZAKI M., TASHIRO H., ANDO A., IKEMURA T., SOEDA E., KIMURA M., BAHARAM S., INOKO H., 1999: Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13282-13287

- SHTAUVERE-BRAMEUS A., GHADERI M., RUMBA I., SANJEEVI C.B., 2002: Microsatellite allele 5 of MHC class I chain-related gene A increases the risk for insulin-dependent diabetes mellitus in Latvians. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958: 349-352
- SOUTHERN E. M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- SUEMIZU H., RADOSAVLJEVIC M., KIMURA M., SADAHIRO S., YOSHIMURA S., BAHRAM S., INOKO H., 2002: A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2971-2976
- TAY G.K., HUI J., GAUDIERI S., SCHMITT-EGENOLF M., MARTINEZ O.P., LEELAYUWAT C., WILLIAMSON J.F., EIERMANN T.H., DAWKINS R.L., 2000: PERB11 (MIC): a polymorphic MHC gene is expressed in skin and single nucleotide polymorphisms are associated with psoriasis. *Exp. Immunol.* 119: 553-558
- THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921-923
- TOUITOU I., PICOT M.C., DOMINGO C., NOTARNICOLA C., CATTAN D., DEMAILLE J., KONE-PAUT I., 2001: The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 44: 163-169
- TOWBIN H., STAEBLIN T., GORDON J., 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- WALLACE G.R., VERITY D.H., DELAMAINE L.J., OHNO S., INOKO H., OTA M., MIZUBI N., YABUKI K., KONDIATIS E., STEPHENS H.A.F., MADANAT W., KANAWATI C.A., STANFORD M.R., VAUGHAN R.W., 1999: MIC-A allele

profiles and HLA class I associations in Behçet's disease. Immunogenetics 49: 613-617

ZWIRNER N.W., FERNANDEZ-VINA M.A., STASTNY P., 1998: MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. Immunogenetics 47: 139-148

ZWIRNER N.W., MARCOS C.Y., MIRBAHA F., ZOU Y., STASTNY P., 2000: Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. Hum Immunol 61: 917-924

Lebenslauf

Name:	Perris-Fabian Flügge
Geburtsdatum:	15.06.1971
Geburtsort:	Hildesheim
1977-1981	Besuch der Grundschule Clauen
1981-1983	Besuch der St. Augustinus-Schule in Hildesheim
1983-1991	Besuch des Gymnasium Josephinum in Hildesheim mit Abschluß „Allgemeine Hochschulreife“
1991-1993	Wehrdienst bei der Fernspähkompanie 100 in Braunschweig
1993-2000	Studium der Biologie an der Universität Hannover mit Abschluß als Diplom-Biologe Thema der Diplomarbeit war „Charakterisierung von MHC-Klasse-I-Genen des Grauen Mausmakis (Microcebus murinus)“
Juni 2000	Beginn der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Immungenetik der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Thema „Untersuchung zur Charakterisierung von MIC-Genen im Haupthistokompatibilitätskomplex des Rhesusaffen (Macaca mulatta)“

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Günther danke ich für die Vergabe des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Weiterhin danke ich ihm für die Bereitstellung der guten Arbeitsmöglichkeiten und die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen.

Frau Prof. Dr. E. Zimmermann danke ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung meiner Dissertation und ihre Anregungen für die Gestaltung der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lutz Walter für die wissenschaftliche Betreuung und die stets guten Ratschläge bei der Durchführung der Versuche, die kritische Durchsicht des Manuskripts und für die gute Zusammenarbeit.

Bei allen weiteren Mitarbeitern der Abt. Immunogenetik, Herrn Dr. Ralf Dressel, Leslie Elsner, Petra Kiesel, Elisabeth Munk und Nico Westphal bedanke ich mich vor allem für die gute Arbeitsatmosphäre,, aber auch für ihren Rat und ihre Hilfe bei allen Problemen.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Deutschen Primatenzentrums in Göttingen, Herrn Prof. Dr. F.-J. Kaup, Frau Dr. U. Saueremann, Frau Dr. C. Stahl-Hennig und Christian Roos für das zur Verfügung gestellte Rhesusaffenmaterial. Besonders danke ich auch Karin Kaiser-Jarry und Nadine Knöchelmann für ihre Hilfe bei der Immunhistologie.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie: meinem Vater, der durch seine finanzielle Unterstützung mein Studium erst möglich gemacht hat, Petra Brandes, meinen Großeltern und meiner Schwester für die stets aufmunternden und anspornenden Worte.

Vor allem aber danke ich meiner Frau Almut Bloch, die mich immer liebevoll unterstützt und auch in schwierigen Phasen wieder motiviert hat.

Finanziert wurde diese Arbeit durch das Graduiertenkolleg „Perspektiven der Primatologie“ (GRK 289).