

Aus dem Med. Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. Diethard Gerns

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg

***Polymorphismusanalyse von vier MHC Klasse I
Genen im Hund***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Michael Benjamin Graumann
aus Krefeld
Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.09.2005
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch
Referent: Prof. Dr. D. Gemsa
Correferent: PD Dr. Berger

Arbeiten wurden selbständig am Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle,
Washington, USA, durchgeführt.

Gewidmet meiner Mutter Dorothea Graumann

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	6
2. Einleitung	8
2.1 Knochenmarktransplantation	8
2.2 Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC)	9
2.2.1 MHC Klasse I	10
2.2.2 MHC Klasse II	11
2.2.3 MHC Klasse III	12
2.2.4 MHC Klasse I in Hunden	13
2.3 MHC Klassen II und III in Hunden	13
2.4 Das Hundemodell	14
2.5 Polymorphismus und Typisierungs-Systeme	15
2.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit	15
3. Material und Methoden	17
3.1 Versuchstiere	17
3.2 Reagenzien und Materialien	17
3.3 Separation der weißen Blutkörperchen	18
3.4 DNA-Isolierung	18
3.5 PCR-Amplifikation	19
3.6 Reinigung der PCR-Produkte	20
3.7 Subklonierung der vier Gene	20
3.7.1 Ligation und Transformation	20
3.8 Einzel-Strang-Konformations-Polymorphismus-Analyse	22
3.9 Sequenzierung	22
4. Ergebnisse	24
4.1 DLA-88	26
4.2 DLA-12	29
4.3 DLA-64	30
4.4 DLA-79	30
4.5 Vergleich zellulärer und molekularer Methoden für MHC-Typing	32

5. Diskussion	34
6. Literaturverzeichnis	44
7. Zusammenfassung	49
8. Publikationen im Rahmen dieser Arbeit	51
9. Lebenslauf	52
10. Verzeichnis der akademischen Lehrer	53
11. Danksagung	54

1. Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
Cl	Chlorid
dest.	destilliert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DLA	Dog Leukocyte Antigen (Hunde Leukozyten-Antigen)
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
EDTA	Ethylene-Diamin-Tetra-Acetic Acid
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GVHD	Graft versus Host Disease
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen (menschliches Leukozyten-Antigen)
HVGD	Host versus Graft Disease
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kD	KiloDalton
μ	Mikro
μl	Mikroliter
m	milli
M	Mol/Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histokompatibilitäts-Komplex (Haupt-

Histokompatibilitätskomplex)

min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmol	Millimol
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pmol	picomol
sek	Sekunden
TE	TrisEDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-Zelle	Lymphozytenart, die im Thymus gebildet wird
U/min	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid

2. Einleitung

2.1 Knochenmarktransplantation

Knochenmarktransplantationen werden heutzutage zur Therapie vieler maligner und nichtmaligner lymphohämatopoetischer Systemerkrankungen eingesetzt (Storb, 1999; Storb et al., 1999b). Dazu zählen kongenitale Defekte der Hämatopoese und des Immunsystems (z. B. schwere kombinierte Immundefizienzen und Thalassaemia major), erworbene Knochenmarkdysfunktionen (z. B. aplastische Anämie), akute und chronische Leukämien (Matthews et al., 1999) sowie maligne Lymphome (Storb et al., 2000). Auch Ataxia teleangiectatica, Sichelzellanämie (Walters et al., 1996), infantile Agranulozytose, chronische Granulomatose, Blackfan-Diamond-Anämie (angeborene chronische Form der Pure red cell aplasia - Erythroblastopenie), Fanconi-Anämie, Wiskott-Aldrich-Syndrom, chronische mukokutane Candidiasis, Morbus Gaucher und andere Speicherkrankheiten stellen weitere Indikationen zur Knochenmarktransplantation dar (Thomas, 1996).

Die prinzipielle Idee der Transplantation ist, entartetes Knochenmark eines Empfängers durch gesundes eines Spenders (oder Donors) zu ersetzen. Das Problem dabei ist, daß im Knochenmark entstehende Zellen für die Erkennung körpereigener bzw. fremder Zellen zuständig sind, und sich Körperzellen eines jeden Menschen mehr oder weniger voneinander unterscheiden. Das heißt, Spender- und Empfängerknochenmarkzellen erkennen sich als fremd an. Es muß daher vor einer Knochenmarktransplantation gewährleistet sein, daß Spender und Empfängerknochenmarkzellen möglichst ähnlich sind, was bedeutet, daß Spender und Empfänger gezielt ausgewählt werden müssen. Knochenmarkspender werden nach genotypischen Kriterien ausgesucht, speziell nach HLA-A-, -B-, -C-, -DR-, -DQ-Übereinstimmungen mit dem Empfänger.

Eine weitere Methode, das Risiko bei einer Knochenmarktransplantation zu verringern, ist die Immunabwehr des Empfängers auf ein tolerables Minimum zu reduzieren, damit die gespendeten Zellen nicht sofort zerstört werden. Des weiteren beabsichtigt man, möglichst viele erkrankte Zellen zu vernichten. Dies wird mit einer Ganzkörperbestrahlung und der Gabe von Immunsuppressiva erreicht. Nach der Infusion der Donorzellen erhält der Rezipient weiterhin Immunsuppressiva und T-Zell-Inhibitoren in einer abnehmenden Dosis für mehrere Wochen, um Reaktionen sowohl der Spender- als auch der Empfängerzellen zu verhindern.

Die aufwendige Entnahme des Knochenmarkes aus den Beckenkämmen unter Anästhesie ist durch die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen aus peripherem

Blut weitgehend abgelöst worden (Bensinger und Storb, 2001). Um diese Entwicklung in Zahlen auszudrücken: 1983 wurden in Europa insgesamt 1353 Patienten (autolog n=473, allogene n=880) mit Transplantaten aus peripheren Stammzellen behandelt. Dabei bedeutet autolog, daß der Patient eigene Stammzellen transplantiert bekommt, die vorher gereinigt wurden, und allogene, daß die Spender und Empfänger einer Familie angehören. 1994 waren es bereits 10450 Patienten (autolog n=6811, allogene n=3639) (Theobald und Storb, 1997). Bei der Suche nach kompatiblen Spendern und Empfängern spielt insbesondere der Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) eine wichtige Rolle. Dieser Komplex bestimmt die Erkennung von fremden und körpereigenen Zellen und ist Kernpunkt dieser Arbeit. Die Gene im MHC unterscheiden sich von Individuum zu Individuum in einzelnen oder mehreren Basenpaaren, d.h. jeder Mensch hat ein unterschiedliches Allel von Genen des MHC. Diese Vielfalt nennt man Polymorphismus.

Punktmutationen im MHC sind mit diversen Erkrankungen assoziiert. So ist zum Beispiel die rheumatische Arthritis in Zusammenhang mit dem Allel HLA-DR4 zu finden, aber auch andere Zusammenhänge wurden beschrieben (Dessen et al., 1997; Tiwari und Terasaki, 1985; Todd et al., 1988; Wucherpfennig und Strominger, 1995). Die stärkste Korrelation ist zwischen HLA-B27 und dem Morbus Bechterew zu finden, eine autogene degenerative Rückenerkrankung. Der MHC hat also einen großen Einfluß auf die Immunologie des Menschen.

2.2 Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC)

Der Major Histokompatibilitäts-Komplex wurde in der Mitte des 20. Jahrhunderts während der Studien von Transplantationen entdeckt. Autologe Hauttransplantationen an einem Individuum zeigten keine Probleme (Autotransplantation). Auch zwischen monozygoten Zwillingen oder Tieren derselben Familie wurden Hauttransplantationen nicht abgestoßen (syngene oder isogene Transplantate). Transplantationen zwischen nicht verwandten Personen stellten sich jedoch als äußerst schwierig dar. Das Transplantat wurde früher oder später abgestoßen, oder, wie im Falle einer Knochenmarktransplantation, reagierte das gespendete Material gegen den Empfänger. Diese Reaktionen, Graft-versus-Host und Host-versus-Graft (Graft = Transplantat, Host = Empfänger), werden von T-Zellen verursacht, die fremde Histokompatibilitätsantigene erkennen (Guillet et al., 1987) (Townsend und Bodmer, 1994). T-Zellen besitzen spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die mit verschiedenen Polypeptiden in

Verbindung stehen, wie z. B. mit dem CD3-Komplex und, abhängig von ihrer Differenzierung, mit dem CD4- oder dem CD8-Komplex. Antigene sind Substanzen, die die Bildung von Antikörpern induzieren. Rezeptoren auf Körperzellen binden an die Antigene und werden, falls als körperfremd erkannt, angegriffen. Diese Reaktionen können in Form leichter Allergien auftreten, sie können jedoch auch zum kompletten Zusammenbruch des Immunsystems führen. Diese Oberflächenrezeptoren werden von verschiedenen Genen des MHC beim Menschen auf Chromosom 6 (Klein, J., 1986), beim Hund auf dem Chromosom 12 codiert. Dies wurde mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) bewiesen (Dutra et al., 1996). Der MHC gliedert sich in drei Regionen oder Klassen.

2.2.1 MHC Klasse I

Die Klasse I Region besteht aus mehreren Genen, von denen einige die Klasse I-Rezeptoren exprimieren. Diese werden auch Klasse Ia Gene genannt. Die Klasse I-Rezeptoren sind auf fast allen Gewebe- und Zellarten zu finden. Ein Rezeptor besteht aus einer schweren Kette, die unter anderem drei extrazelluläre Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, bildet. Außerdem gehören noch ein transmembraner und ein kleiner intrazellulärer Anteil zu diesem Molekül. Die molekulare Masse eines Rezeptors beträgt 45 kD (Wagner et al., 1999). Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen sind die eigentlichen Bindungsstellen für fremde Antigene. Jede dieser beiden Regionen besteht aus einem viersträngigen β -Faltblatt und einer α -Helix (Bjorkman et al., 1987b). Je eine α -Helix von $\alpha 1$ und von $\alpha 2$ sind parallel angeordnet und befinden sich oberhalb des insgesamt achtsträngigen β -Faltblattes, gebildet aus beiden Domänen. Zwischen den Helices ist eine Mulde, die „Peptide Binding Region“ (PBR), in der Antigene binden können (Shawar et al., 1994). Die $\alpha 3$ -Domäne interagiert mit einem nicht kovalent gebundenen Protein, dem β_2 -Mikroglobulin, das auch Bestandteil des Rezeptors ist (Geraghty, 1993) (Townsend und Bodmer, 1994).

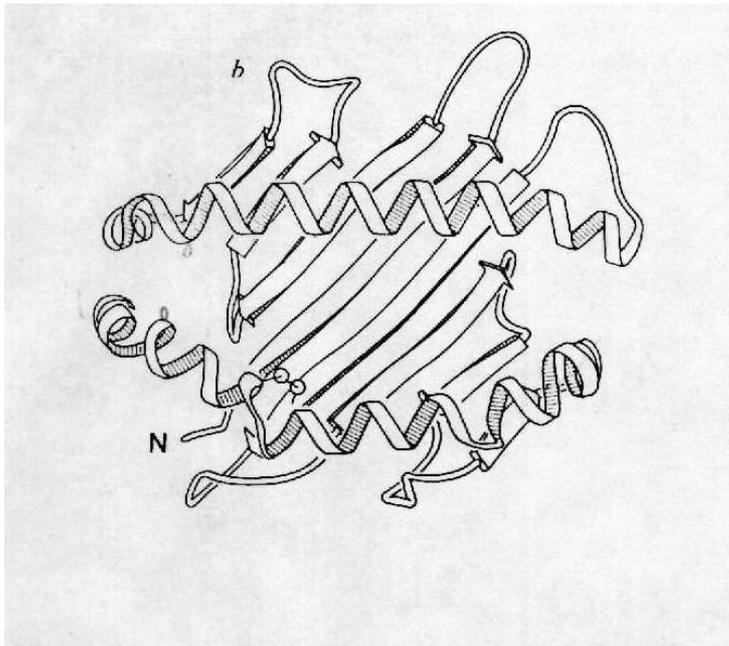


Abb. 2.1 Aufsicht auf einen HLA-A2 Rezeptor (Bjorkman et al., 1987b), einem Klasse I Rezeptor. Zu sehen ist die PBR.

Die Funktion des Rezeptors ist die Präsentation kleiner Proteine, die im Zellinnern synthetisiert werden z. B. im Falle einer Virusinfektion. Diese Proteine werden in kleine Fragmente geschnitten, in der Mulde des Rezeptors gebunden und mit ihm an die Zelloberfläche transportiert, wo sie präsentiert werden. CD8-positive T-Zellen, die im Thymus produziert werden, erkennen die Rezeptoren, „tasten“ sie ab und zerstören die infizierte Zelle (zelluläre Immunantwort).

2.2.2 MHC Klasse II

Der Klasse II-Rezeptor wird im Gegensatz zum Klasse I-Rezeptor nur auf speziellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen gefunden. Die dreidimensionale Struktur der Rezeptoren der beiden Klassen sind jedoch vergleichbar (Brown et al., 1993). Obwohl der Klasse II-Rezeptor aus zwei Ketten, einer α - und einer β -Kette, besteht, bilden diese mit ihrer α 1- und β 1-Domäne ein dem Klasse I-Rezeptor sehr ähnliches Molekül. Jede Kette bildet eine α -Helix über einem β -Faltblatt, so daß zwischen den Helices ebenfalls eine Mulde entsteht, in der Antigene binden können. Der Unterschied dieser gebundenen Antigene gegenüber denen der an Klasse I-Rezeptoren gebundenen ist,

daß die Peptide von außen in die Zelle gelangen (Phagozytose) und dort zerteilt, an den Klasse II-Rezeptor gebunden und anschließend an die Oberfläche transportiert werden. Sie sind also, im Gegensatz zu Klasse I-Antigenen, keine in der Zelle synthetisierte Produkte. Auf die am Rezeptor gebundenen Antigene reagieren $CD4^+$ T-Zellen, indem sie eine Immunantwort initiieren, die T-Helferzellen, Interleukine 1 und 2, Gammainterferon, B-Zellen etc. beinhaltet (humorale und zelluläre Immunantwort).

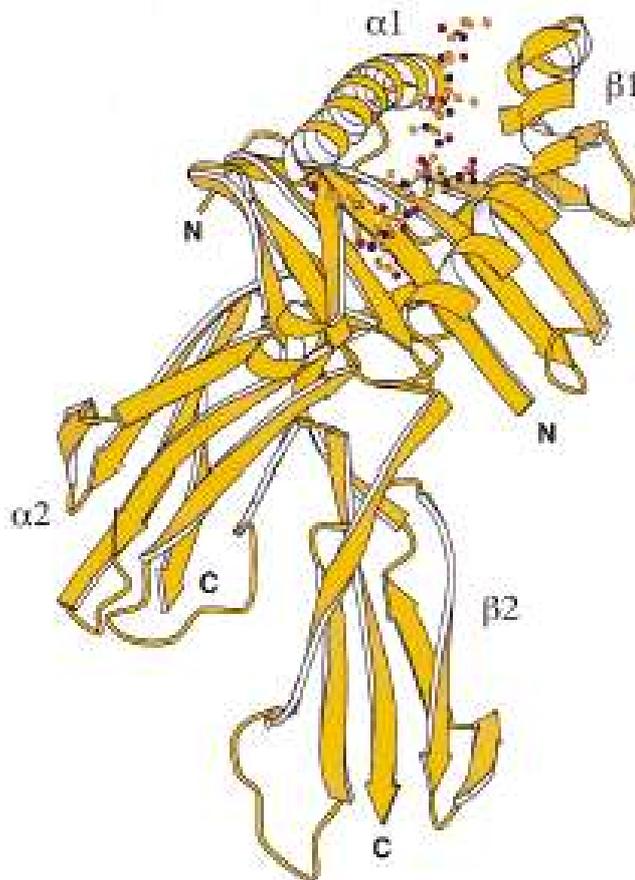


Abb. 2.2 3D-Struktur eines Klasse II-Rezeptors (Dessen et al., 1997)

2.2.3 MHC Klasse III

Die Klasse III Region des MHC birgt noch immer viele Geheimnisse. Bis jetzt ist noch kein Klasse III-Rezeptor identifiziert worden. Die Klasse III Region, beim Menschen lokalisiert zwischen der Klasse II und der Klasse I Region auf dem Chromosom 6, beinhaltet mehrere Gene (z. B. $TNF-\alpha$ und $-\beta$), die sowohl immunologische als auch nichtimmunologische Funktionen haben (Nedospasov et al., 1991). Strukturell sind diese Gene nicht mit denen der Klasse I und II verwandt. Des weiteren sind sie nicht relevant für die Antigenpräsentation (Wagner et al., 1999).

2.2.4 MHC Klasse I in Hunden

Die Gene der Klasse I in Hunden, DLA (dog leukocyte antigen) genannt, sind denen im Menschen (HLA-A, -B und -C) sehr ähnlich. Sie bestehen aus acht Exons und sieben Introns. Das erste Exon mit einer Größe von 72 bp, also für 24 Aminosäuren, codiert das Startpeptid (Leader). Das zweite Exon (270 bp, 90 AS) exprimiert die α 1-Domäne, Exon drei (276 bp, 92 AS) die α 2-Domäne und Exon vier die α 3-Domäne. Die Exons fünf bis sieben codieren die transmembrane Region und Exon acht den zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors. In dieser Arbeit wurden nur die ersten drei Exons untersucht, da sie die außerhalb der Zelle gelegenen polymorphen Anteile der Rezeptoren codieren. Diese Anteile wären bei späteren Untersuchungen im Hinblick auf ein Typisierungssystem natürlich leichter zugänglich als intrazellulär gelegene Anteile oder die DNA selbst.

Bis jetzt sind sieben Gene in der Klasse I des MHC in Hunden bekannt (Burnett et al., 1997). Ihre Namen entstanden durch die Restriktionsfragmentlänge, nachdem die DNA mit dem Enzym *Hind*III zerschnitten wurde, angegeben in Kilobasenpaaren (kb). Eines der sieben Gene, cIpg 26 (2,6 kb), ist ein prozessiertes Gen. Alle acht Exons sind ohne Introns miteinander verbunden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um ein funktionsfähiges Gen handelt, sondern eher um ein Pseudogen. Zwei Gene, DLA-12a (12 kb) und DLA-53 (5,3 kb), sind zerstückelte Gene. DLA-53 enthält die ersten drei Exons und DLA-12a die Exons 4 bis 8. Aus diesen Gründen wurden diese drei Gene aus der Polymorphismusanalyse ausgeschlossen (Burnett et al., 1997). Die anderen vier Gene, DLA-12 (12 kb), -88 (8,8 kb), -79 (7,9 kb) und -64 (6,4 kb), sind ihrer Struktur nach voll funktionsfähig. Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welches dieser Gene die Oberflächenrezeptoren codiert. Die Analyse der vier Gene (DLA-12, -88, -79, -64) sollte unter anderem darauf einen Hinweis geben.

2.3 MHC Klassen II und III in Hunden

Die Struktur der Klasse II-Gene ist bei Säugetieren sehr genau analysiert worden, und es wurden enge Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Spezies gefunden. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die einzelnen Genfamilien in der Klasse I getrennt und tragen daher auch verschiedene Namen in den unterschiedlichen Säugetieren. Klasse II-Gene werden in den meisten Fällen deshalb gleich benannt (z. B. DRB). Die Moleküle der

Klasse II im Menschen, HLA-DR, -DQ, -DM und -DP, bestehen aus $\alpha\beta$ -Hetero-Dimeren, die aus einer α -Kette (MW 34 kD) und einer β -Kette (MW 29 kD) zusammengesetzt werden. In den 80er Jahren, ähnlich der Klasse I, wurden mit menschlichen Klasse II cDNA-Proben bei Southernanalysen die Anzahl der Klasse II A und B Gene untersucht (Sarmiento und Storb, 1988a) (Sarmiento und Storb, 1988b). Es wurden im weiteren mindestens drei polymorphe Gene gefunden (DRB, DQA und DQB) (Sarmiento et al., 1992; Sarmiento et al., 1993; Sarmiento et al., 1990). Der DRA-Locus scheint monomorph zu sein (Wagner et al., 1995a).

Eine wichtige Besonderheit der Klasse II im Hund ist das Vorhandensein der Rezeptoren auf fast allen Lymphozyten (Doxiadis et al., 1989) im Gegensatz zu Menschen und z. B. Mäusen. Bisher sind sechs Gene der Klasse II im Hund bekannt. DRA ist ein strukturell komplettes, aber scheinbar monomorphes Gen (Wagner et al., 1995b). Der DRB-Locus besteht aus einem polymorphen DRB1-Gen und einem Pseudogen DRB2 (Wagner et al., 1996b; Wagner et al., 1996c). Außerdem liegen im DQ-Bereich noch ein begrenzt polymorphes Gen namens DQA (Wagner et al., 1996a), ein polymorphes DQB und ein Pseudo-DBQ-Gen (Wagner et al., 1998).

Die Klasse III des MHC im Hund beinhaltet Gene, die das Komplementsystem kodieren sowie TNF alpha und beta.

2.4 Das Hundemodell

Studien an zufällig gekreuzten Hunden und dem DLA-Komplex, der analog zum menschlichen MHC-Komplex ist, waren die instrumentellen Hilfen in der Entwicklung der Grundsätze von Knochenmarktransplantationen am Menschen seit über 40 Jahren. Mitte der 60er Jahre wurden diese Studien begonnen (Storb et al., 1967) und die Methode bis zum Einsatz im Menschen weiterentwickelt (Thomas et al., 1970). Der Erfolg der Forscher in der Übertragung von Beobachtungen zwischen Mensch und Hund liegt vor allem daran, daß beide, Menschen und Hunde, hochgezüchtete und hochgradig polymorphe Spezies sind (Vriesendorp et al., 1977). Daher dienen die Protokolle, die am Hund zur Prävention von der Graft-versus-Host Krankheit und Transplantatabstoßung ermittelt worden sind, als Modell für die hohe Vielfalt, die im menschlichen Immunsystem beobachtet werden kann. Viele klinische Fortschritte bei menschlichen Knochenmarktransplantationen, beginnend mit *in vitro* Typisierungen der Histokompa-

tibilität, wurden initial am Hundemodell beschrieben und entwickelt (Storb et al., 1995) (Storb et al., 1968) (Epstein et al., 1968) (Deeg und Storb, 1994) (Ladiges et al., 1990). 1990 wurde die erste Klasse I Probe, I16 genannt, im Hund isoliert und sequenziert (Sarmiento und Storb, 1990). Die Sequenz war zu 80% identisch mit dem HLA-A, -B und -C Konsensus des Menschen. Das erste identifizierte Gen war DLA-79. Es wurde ursprünglich aus einer Phagen-Bibliothek des Hundes beim Screenen mit einer menschlichen HLA-E cDNA isoliert (Burnett und Geraghty, 1995). Diese anfängliche Studie zeigte auch, mittels Southern Blottings, das Vorhandensein von mindestens sieben Klasse I-Genen im Hund (Burnett et al., 1997).

2.5 Polymorphismus und Typisierungs-Systeme

Polymorphismus (Vielgestaltigkeit) bedeutet das gleichzeitige Vorkommen von verschiedenen Genotypen oder auch Allelen (Varianten) eines Genes in einer Spezies. Zum Beispiel kann es zu Veränderungen der Sequenz eines Genes durch Mutationen kommen. Einige dieser Veränderungen bleiben unbemerkt und verändern die codierten Gene nicht. Andere hingegen erzeugen veränderte, falsche oder defekte Genprodukte. Findet man einen hohen Anteil an Polymorphismen in Gensequenzen, die Rezeptoren codieren, so kann dies ein Hinweis darauf sein, daß verschiedene Antigene oder nur spezifische Antigene an den Rezeptor binden. Je mehr Allele eines Genes des MHC bekannt sind, desto genauer kann also eine Suche nach geeigneten Spendern und Empfängern durchgeführt werden. Typisierungs-Systeme sollen diese Suche vereinfachen. Durch einfache, schnelle, gezielte und kostengünstige Untersuchungen der wichtigsten Gene soll eine möglichst große Übereinstimmung zwischen Spenderorgan und Empfänger erreicht werden, um die gefürchteten Abstoßreaktionen zu verhindern.

2.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welches der sieben bisher bekannten Gene der Klasse I des MHC im Hund für die Expression des Oberflächenrezeptors verantwortlich sein könnte. Die Gene DLA-12a und -53 fielen aufgrund ihrer unvollständigen Struktur aus dieser Studie heraus, ebenso wie c1sp26, das prozessierte Gen. Ich habe mich also ausschließlich auf die Gene DLA-12, -88, -79 und -64

konzentriert. Durch das Sequenzieren möglichst vieler Proben von verschiedensten Hunderassen sollte sich zeigen, welches dieser Gene die meisten Allele aufweist. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnte postuliert werden, welches Gen den Rezeptor codiert. In der Zukunft soll dann ein System erstellt werden, das die Kompatibilität zweier Hunde in bezug auf eine Transplantation schnell überprüft. Da auch die Klasse II des MHC eine Rolle bei Transplantationen spielt, soll in Zukunft eine kombinierte Untersuchung, die beide Klassen einbezieht, entwickelt werden. Auch wurden Hunde analysiert, die bisher aufgrund serologischer Untersuchungen als homozygot angesehen wurden, um festzustellen, welche Untersuchungsmethode genauer ist.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Blutproben wurden von insgesamt 63 nicht verwandter Hunde unterschiedlicher Rassen und Herkunft gewonnen. Die Blutentnahme wurde an der Vorderhand durchgeführt. Nach der Desinfektion wurde mit einer sterilen Nadel die vena cephalica punktiert und 10 ml Blut entnommen. Diese Menge war für die Studien ausreichend. Die Hunde stammten zum Großteil aus der hauseigenen Zucht des Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC), Seattle, USA. Diese Hunde wogen zwischen 7,1 und 15,7 kg und waren zwischen 6 und 13 Monate alt. In zweimonatiger Quarantäne wurden die Hunde auf Erkrankungen hin beobachtet und gegen Leptospiren, Hepatitis, Tollwut, Papilloma- und Parvovirus geimpft. Weitere Proben wurden Hunden der Bellevue Humane Society, einem örtlichen Tierheim, sowie einigen Hunden eines Military Army Depots entnommen. Die verschiedenen Hunderassen beinhalteten Beagle, Schäferhund, Collie, Rottweiler, Husky, Labrador und viele Mischlinge, um nur einige zu nennen. Alle Hunde waren gesund und in guter Kondition. Insbesondere die Hunde des FHCRC wurden nach den aktuellsten Richtlinien für Labortiere und deren Pflege, herausgegeben von der National Academy of Sciences, National Research Council, gehalten. Die Protokolle der Studien überprüfte das Institutional Animal Care and Use Committee des Fred Hutchinson Cancer Research Centers. Die Zwinger wurden von der American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care zertifiziert.

3.2 Reagenzien und Materialien

Alle Reagenzien und Materialien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), Gibco BRL (Grand Island, NY), Novagen (Madison, WI), Difco Laboratories (Detroit, MI), Applied Biosystems (ABI) (Foster City, CA), Falcon (Lincoln Park, NJ), Hybaid Limited (Middlesex, England), FMC BioProducts (Rockland, Maine), Qiagen (Santa Clarita, CA) und Island Scientific (Bainbridge Island, WA) erworben.

3.3 Separation der weißen Blutkörperchen

Um eine Koagulation zu verhindern, wurde das gewonnene Blut noch vor Ort mit 0,4 ml 5% Na₂EDTA / 0,9% NaCl versetzt. Das Blut wurde dann mit 40 ml haemolytischer Pufferlösung in ein 50 ml Falcon®-Probenröhrchen gefüllt und auf Eis gelagert, bis die Farbe im Röhrchen zu einem tiefen Rot wechselte (ca. 30 min). Die Rotfärbung ist ein Zeichen dafür, daß die Erythrozyten zerstört und der Farbstoff Hämoglobin freigesetzt worden sind.

Haemolytische Pufferlösung:	Ammonium Chlorid (NH ₄ Cl)	4,15 g
	Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	0,5 g
	EDTA	18,6 mg
	mit aqua dest. auf 500 ml Gesamtvolumen bringen.	

Nach der Inkubation wurde mit 1200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment, welches überwiegend weiße Blutkörperchen enthielt, nochmals mit haemolytischer Pufferlösung gewaschen, um verbliebene rote Blutkörperchen zu beseitigen. Dann wurde die Zentrifugation wiederholt (1200 x g, 10 min). Das Sediment wurde dann mit 1 x PBS gewaschen, zentrifugiert und luftgetrocknet. Zum Abschluß wurden die weißen Blutkörperchen in 3 ml 1 x PBS gelöst und auf drei 2 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zwei dieser Röhrchen mit weißen Blutkörperchen wurden bei -70° C als Reserve eingefroren und das dritte Röhrchen der DNA-Gewinnung zugeführt.

3.4 DNA-Isolierung

Die weißen Blutkörperchen wurden in 0,9 ml 1 x PBS resuspendiert und auf zwei 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt. Es wurden 250 µl Lysis Buffer (ABI) und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugefügt und bei 60° C für 2 Stunden inkubiert, um die Leukozyten aufzubrechen. Diese Mischung wurde mit der gleichen Menge (ca. 1,2 ml) Phenol-Chloroform (ABI) gewaschen und für zwei Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Dann wurde erneut mit Phenol-Chloroform gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000 x g, 2 min) wurde der Überstand

mit reinem Chloroform (ABI) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der Isolierung des Überstandes wurden 1/10 seines Volumens an 3 M NaOAc und das gleiche Volumen des Überstandes an Isopropanol beigefügt und gevortext. Danach wurde mit 13000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das sichtbare Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, um das zusätzliche Salz in der DNA zu beseitigen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde die DNA getrocknet und in 50-200 µl TE (10 mM TrisCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) gelöst (Bell et al., 1981).

3.5 PCR-Amplification

Ein wichtiger Teil der Genuntersuchungen war die Lokalisation und Vervielfältigung der Gensequenzen. Im Genom von Säugetieren sind die Informationen vieler Gene (weit mehr als 10000) enthalten. Um ein bestimmtes Gen zu analysieren, waren früher viele zeitaufwendige Versuche nötig. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, in kurzer Zeit die Sequenz, d.h. die Codierung der Aminosäureihenfolge eines Genes zu finden und in großer Menge zu duplizieren. Um eine PCR durchzuführen, benötigt man zwei spezifische Oligonukleotidsequenzen (Primer), deren Sequenzen das gesuchte Gen flankieren, freie Nukleotide und das Enzym Taq-DNA-Polymerase. Durch Erhitzen werden die beiden Stränge der DNA getrennt (Denaturierung). Dann binden die Primer jeweils am 3' Ende eines Stranges angrenzend an die gesuchte Sequenz. Die Taq-Polymerase beginnt bei seinem Temperaturoptimum von 72° C komplementäre Stränge mit Hilfe der freien Nukleotide aufzubauen. Die Polymerase verlängert die Primer, indem es die Matrizenstränge kopiert. So entstehen zwei neue DNA-Stränge, die dem gesuchten Gen entsprechen. Im nächsten Zyklus der Reaktion stehen also doppelt so viele DNA-Stränge zur Vervielfältigung zur Verfügung. Am Ende einer PCR mit n Zyklen erhält man somit theoretisch 2^n doppelsträngige DNA-Moleküle.

Zur Durchführung der Versuche wurden 20-40 pmol der beiden Primer, 20 µmol dNTPs (freie Nukleotide), 1,5 mmol MgCl₂ und 5 µl 10x Elmer-Perkins Standard PCR-Pufferlösung in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Zunächst wurde der Reaktionsmix 5 Minuten bei 94° C erhitzt (Denaturierung). Dann folgten 30 Zyklen mit jeweils 94° C für 1 min, 65° C für 2 min und 72° C für 3 min. Die PCR-Produkte betragen 1,1 bis 1,4 kb und wurden mit Ethidiumbromid in Agarosegelen nachgewiesen.

3.6 Reinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden und Taq zu reinigen, wurden zwei Verfahren benutzt. Für die eine Methode wurde das PCR-Reaktionsgemisch komplett auf ein Agarosegel geladen. Die Banden mit der DNA wurden herausgeschnitten und mit dem GeneClean® Kit von BIO 101 Inc. (La Jolla, CA) gereinigt. Das Prinzip dieser Methode ist, die DNA in einer salzhaltigen Lösung an kleine Silikonpartikel („Glassmilk“) zu binden und Verschmutzungen und Chemikalien abzuwaschen. Nach mehreren Waschkvorgängen wurde die DNA dann in Wasser gelöst. Zum Abschluß wurde mittels eines kleinen Agarosegels und Ethidiumbromid erneut die Quantität der gewonnenen DNA überprüft.

Die andere Methode zur Reinigung der DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit einer im Kit enthaltenen Pufferlösung vermischt und in ein Filterröhrchen gefüllt. Die DNA wurde im Filter zurückgehalten und konnte dann mit Waschlösungen gereinigt werden. Dann wurde die DNA in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8.5 gelöst und mit einem Agarosegel überprüft. Die zweite Methode war etwas schneller, allerdings auch etwas kostspieliger.

3.7 Subklonierung der vier Gene

Da jedes Gen im gesamten Genom einer Spezies zweimal vorhanden ist, konnten die PCR-Produkte nicht direkt sequenziert werden. Das Vorhandensein zweier Allele hätte die Ergebnisse der Sequenzierung verfälscht. Es war also nötig, die Gene in Plasmide zu klonieren. Dadurch, daß in einen Plasmid auch nur ein Allel eines Genes einkloniert werden konnte, wurde sichergestellt, daß die zwei Allele der Gene aufgeteilt wurden.

3.7.1 Ligation und Transformation

Der erste Schritt war die Ligation der amplifizierten Gene in einen Vektor. Vektoren oder auch Plasmide genannt sind extrachromosomale, doppelsträngige, ringförmig angeordnete DNA-Moleküle, die verschiedenste Informationen tragen können, z. B. Antibiotikaresistenzen. Sie können von Zelle zu Zelle übertragen werden. Dies geschieht auch zwischen verschiedenen Spezies. Plasmide können intrazellulär in mehreren Kopien vorliegen. In dieser Studie wurde der pT7blue-Vektor (Novagen) verwendet. Seine Größe

beträgt 2887 bp und er trägt Informationen, die der *Escherichia coli* Wirtszelle eine Resistenz gegen Ampicillin ermöglicht. Außerdem codiert der Vektor das funktionale LacZ α -Peptid, welches zusammen mit dem LacZ ω -Fragment der Wirtszelle das aktive Enzym β -Galaktosidase bildet. Dieses Enzym ist in der Lage, einen bestimmten Stoff, X-gal, der auf eine Agarplatte aufgetragen wurde, zu spalten und dadurch der wachsenden Zellkolonie eine blaue Farbe zu geben. DNA-Fragmente werden in eine modifizierte *EcoRV* Schnittstelle inkloniert, die sich in der das α -Peptid codierenden Region befindet. Wird der Vektor also ohne eingebaute DNA in Wirtszellen transformiert, so sind diese in der Lage, β -Galaktosidase zu bilden, und die Kolonie färbt sich blau. Wird DNA in den Vektor eingebaut und dieser in Wirtszellen transformiert, so ist die Codeinformation für die β -Galaktosidase unterbrochen, die Zellen können das X-gal nicht mehr spalten, und die Zellkolonien bleiben weiß. Somit ist es möglich, gezielt Kolonien auszuwählen, die auch wirklich die gewünschte Information, in dieser Studie die vier verschiedenen inklonierten Gene bzw. die acht verschiedenen Allele, besitzen. Für einen Ansatz wurden 1 μ l 10 x Ligase Pufferlösung (200 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂), 1 μ l 50 ng/ μ l pT7blue T-Vektor, 0,5 μ l T4 DNA-Ligase und, je nach Konzentration, 3-6 μ l der gereinigten PCR-Produkte verwendet. Mit dH₂O wurde ein Gesamtvolumen von 10 μ l erreicht. Die Inkubationszeit betrug 2 h auf Eis oder über Nacht bei 4° C. Nach dieser Inkubation wurden die Vektoren in XL1-Blue Zellen transformiert. Die Zellen wurden bei -70° C gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen auf Eis wurden jeweils 20 μ l in 1,5 ml Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. 1 μ l des Ligationgemisches wurde zugeführt und nach vorsichtigem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle standen Testplasmide der Firma Novagen zur Verfügung. Anschließend wurden die Röhrchen 1 min bei 42° C erhitzt und dann wieder 2 min auf Eis gelagert. Nun wurden 80 μ l SOC Medium (0.5% Hefe Extrakt, 2.0% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) beigefügt und das ganze für 1 h bei 37° C auf einem Shaker (200 - 250 U/min) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden LB-Agarplatten, die 100 μ g/ml Carbenicillin enthielten, mit 35 μ l 50 mg/ml X-gal und 20 μ l 100 mM IPTG (in Wasser gelöst) bestrichen. IPTG induziert die Produktion von β -Galaktosidase in der Zelle. Nach der einstündigen Inkubation der Zellen wurden 50 μ l der Reaktion auf den Agarplatten ausgebreitet. Diese verblieben dann über Nacht bei 37° C. Sobald die Zellkolonien eine ausreichende Größe erreicht hatten und zwischen blauen und weißen Kolonien unterschieden werden konnte, wurden 3-8 Kolonien mit einer ausgeglühten Platinöse selektioniert und in 50 ml Kulturen vermehrt. Die Extraktion der Plasmide aus

den Bakterien erfolgte nach den Standardprotokollen der Firma Qiagen (Plasmid Midi Protocol).

3.8 Single-Strand-Konformations-Polymorphismus-Analyse

Die Single-Strand-Konformation-Polymorphismus-Analyse (SSCP) wurde nach Protokollen von MDE (Mutation Detection Enhancement) auf nicht denaturierenden Polyacrylamid Gelen von FMC Bioproducts durchgeführt (Friedman et al., 1994). Die zugrunde liegende Theorie für diese Methode besagt, daß der Austausch einzelner Basen einer Sequenz die Struktur im DNA-Strang in einer Weise verändert, daß man auf speziellen Gelen diese verschiedenen Sequenzen auftrennen kann. Genaue Ergebnisse erhält man jedoch nur bis zu einer Länge der DNA von ungefähr 350 - 400 Basenpaaren. PCR-Reaktionen wurden mit Primern angesetzt, die auf jeder Seite der Exons zwei und drei lagen. Fragmente mit weniger als dreihundert bp in Länge wurden amplifiziert, nachdem radioaktive $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-Nukleotide inkorporiert wurden. Diese Fragmente wurden auf nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen analysiert. Einzelne Banden wurden unmittelbar aus dem Gel geschnitten und in 100 μl TE gelöst. Davon wiederum wurden 5 μl der Probe ein zweites Mal mit den selben Primern amplifiziert. Die Resultate wurden dann direkt in beiden Richtungen sequenziert.

3.9 Sequenzierung

Die beste verfügbare Methode zur Sequenzierung der vier Gene war die „Dye Terminator Cycle Sequencing“ (Farbstoff-Stopplösung Zyklus Sequenzierung). Die Vorteile waren: nur ein Ansatz pro Reaktion, dasselbe Protokoll für einzel- und doppelsträngige DNA, eine geringere Menge an DNA und einfachere Sequenzierung von großen Ausgangsprodukten (bis zu 48 kb). Das Grundprinzip dieser Reaktion war nicht neu. Die zu sequenzierende DNA wurde denaturiert, ein Primer wurde an den Anfang der Sequenz gebunden und eine Polymerase, ähnlich der Taq-Polymerase, die an dem Primer ansetzte, begann, den komplementären Strang aus freien Nukleotiden aufzubauen. Dem Reaktionsmix wurden jedoch auch Dideoxynukleotide beigefügt. 2' 3'-Dideoxynukleotide konnten nur eine Bindung über das 5'Triphosphat mit anderen Nukleotiden eingehen,

allerdings keine weitere Phosphordiester-Bindung. Dies bewirkte folglich einen Abbruch der Reaktion. Da beide Formen der Nukleotide, dNTPs und ddNTPs, zur Verfügung standen, wurde die Herstellung des komplementären Stranges an unterschiedlichen Stellen gestoppt und unterschiedlich lange Fragmente entstanden. Diese Fragmente konnten dann auf ein Acrylamid-Gel geladen werden und, durch die unterschiedliche Größe und somit unterschiedliche Laufstrecke der Fragmente, die Sequenz ermittelt werden. Der Unterschied zu herkömmlichen Methoden war, daß die ddNTPs mit fluoreszierendem Farbstoff markiert waren. Daher war es nicht nötig die Primer radioaktiv zu markieren, und es gab keinen radioaktiven Abfall. Das hitzebeständige Enzym, welches für die Sequenzierungsreaktion benötigt wurde, war die AmpliTaq® DNA Polymerase und eine weiterentwickelte Form, die AmpliTaq® DNA Polymerase, FS. Die Analyse wurde mit dem automatischen Sequenzer ABI 373A durchgeführt.

Jedes Allel wurde mit vier Primern sequenziert. Diese Primer waren so angeordnet, daß zwei außerhalb der zu analysierenden Sequenz ansetzten und zwei innen zwischen Exon 2 und 3. Dadurch erhielt man zwei Sequenzen in entgegengesetzter Richtung, die miteinander verglichen werden konnten, um einen Konsensus zu bilden. Die neuen Sequenzen wurden mit der eines männlichen Beagles (D100) verglichen. Dieser Beagle wurde in dem Fred Hutchinson Cancer Research Center gezüchtet und wegen seiner Homozygotie nach DLA-D Kriterien, die in Mixed lymphocyte culture assays (MLC) ermittelt worden waren (Deeg et al., 1986a), ausgesucht. Daher war es auch sehr wahrscheinlich, daß D100 für den gesamten DLA-Komplex homozygot war. Für einen Ansatz (20 µl) der Reaktion wurden 8 µl Dye Terminator Ready Reaction Mix, 3.2 pmol Primer, je nach Quantität und Qualität 3 - 6 µl DNA und dH₂O verwendet. Die Reaktion wurde in einem Thermal Cycler Model 480 (ABI) durchgeführt (anfänglich 96° C für 3 min, dann 30 Zyklen: 96° C für 30 sek, 50° C für 15 sek, 60° C für 4 min, danach 4° C bis zur weiteren Verwendung). Die DNA wurde anschließend durch Fällung nach Zugabe von 2 µl Natriumacetat und 50 µl 95% Isopropanol von unverbrauchten Nukleotiden getrennt, nach Zentrifugation in 250 µl 70% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Computer Analyse der Sequenzen wurde mit dem Programm SeqED® Version 1.0 (ABI) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Polymorphismusanalyse der vier Klasse I Gene des MHC im Hund, DLA -12, -88, -79 und -64, wurde mit detaillierten Sequenzanalysen durchgeführt. Dazu wurden zunächst Blutproben von 25 Hunden der Bellevue Humane Society, einem Tierheim in der Nähe Seattles, untersucht. Es handelte sich hauptsächlich um Mischlinge der verschiedensten Hunderassen. Dadurch sollte ein Überblick geschaffen werden, um abschätzen zu können, wieviele Hunde insgesamt untersucht werden mussten. Aus diesen Blutproben wurde die DNA isoliert, und die einzelnen Gene wurden mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Primer sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tab. 4.1 Spezifizierung der PCR primers.

DLA	Name	Sequenz		Länge
		5'	3'	
12	1628 i3'	AGCCCTCCCTAGTGGAGGCGAGATCGGGGA		30
	1636 5'L	AGAACCGCCAGGACGCAGCTGCTCCACC		28
88	1628 5'L	AGTCCAGCGGCGACGGCCAGTGTCCCCGGA		30
	1628 i3'	AGCCCTCCCTAGTGGAGGCGAGATCGGGGA		30
79	c1sp 39	CTGGAACACGTGGATGCCTGTCAT		24
	c1sp 40	GAAGCCAGCCCCAGCAGAGTGAAG		24
64	c1sp 38	AGATCCCGGAGTCCCAGCTGCCCCA		25
	c1sp 44	GAGGGCGAGGTCTCAGGCT		19

Die PCR-Produkte wurden dann in Vektoren ligiert und diese in *E. coli* Zellen geschleust, um eine größere Menge an Untersuchungsmaterial zu gewinnen und die Allele der Gene aufzuteilen, um diese einzeln zu sequenzieren. Die Zellen wurden kultiviert und die DNA wiedergewonnen. Dann wurden mittels der „Dye Terminator“-Methode mit den in Tab. 4.2 aufgelisteten Primer die Exons eins bis drei sequenziert.

Tab. 4.2 Sequenzierungs-Primer.

DLA	Name	Sequenz		Länge
		5'	3'	
12	1. M 13	TGTAACGACGGCCAGT		18
	2. T 7	TAATACGACTCACTATAGGG		20
	3. c1sp 35	TCCCGGGACTACTAGGGTGTTCAC		24
	4. c1sp 31	CTCGGACTCGGGGTGACGCCCGGAC		25
88	1. M 13	TGTAACGACGGCCAGT		18
	2. T 7	TAATACGACTCACTATAGGG		20
	3. c1sp 30	GTCCGGGCGTCACCCCGATGCCGAG		25
	4. c1sp 31	CTCGGACTCGGGGTGACGCCCGGAC		25
79	1. M 13	TGTAACGACGGCCAGT		18
	2. T 7	TAATACGACTCACTATAGGG		20
	3. c1sp 42	GACGGGGATGGCGACCTGGA		20
	4. c1sp 41	GTAGACTTTCGTGCTGACA		19
64	1. T 7	TAATACGACTCACTATAGGG		20
	(M 13)	TGTAACGACGGCCAGT		18
	2. c1sp 43	AGTCCGGCGGGCAGGCCAGTGTC		24
	3. c1sp 36	TTCATGGACTCGTGAAGTGG		20
	4. c1sp 37	TGACGGCGGGGACCGGGCTA		20

Die Primer 1. und 2. waren die externen Primer, die Primer 3. und 4. die internen. DLA-64: In einigen Fällen war es nötig, den Primer M13 zu benutzen.

Die Primer waren so angeordnet, daß bei jedem Gen jeweils ein Primer kurz vor dem Exon eins und ein Primer kurz hinter dem Ende von Exon drei ansetzte. Dies waren die externen Primer. Die zwei weiteren internen Primer wurden so gewählt, daß sie zwischen Exon zwei und drei lagen. Auf diese Weise erhielt man vier Sequenzen, zwei in 5'-3'-Richtung und zwei in 3'-5'-Richtung. Zwei entsprechende gegenläufige Sequenzen

wurden dann verglichen und ein Konsens gebildet, der in der Regel durch einen zweiten Sequenzansatz verifiziert wurde. Es stellte sich schnell heraus, daß die anfänglichen 25 Hunde, besonders bei der Untersuchung von DLA-88, nicht genug waren, und so wurden erneut Blutproben von weiteren 38 Hunden gewonnen und untersucht. Den höchsten Grad an Polymorphismen fand man bei DLA-88. Die drei weiteren Gene, DLA-12, -79 und -64 wiesen nur wenige Polymorphismen auf.

4.1 DLA-88

Die Untersuchung der ersten 25 Hunde erbrachte folgende Ergebnisse: 16 Hunde waren heterozygot und 9 homozygot. Die 16 heterozygoten Hunde wiesen 26 verschiedene Allele auf. Weitere drei neue Allele, die nicht unter den heterozygoten Hunden zu finden waren, zeigten sich bei den neun Homozygoten. Die Tatsache, daß neue Allele bei Homozygoten gefunden wurden, deutete eine unerschöpfliche Anzahl an Allelen von DLA-88 in der Hundepopulation an, deren Ausmaß unmöglich in einer so geringen Anzahl an Hunden zu analysieren war. Die Untersuchung weiterer 38 Hunde brachte 15 neue Allele ans Tageslicht, die noch nicht bei den ersten 25 Hunden gefunden wurden. Die neuen 38 Hunde beinhalteten weitere 21 Rassen, die noch nicht unter den ersten Hunden waren. Ohne Zweifel würde eine Sequenzierung weiterer Subklone von neuen Hunden eine Vielzahl neuer Allele beweisen, doch war dies unnötig, da eindrucksvoll genug dargestellt wurde, daß DLA-88 mit einer Anzahl von 44 Allelen in 63 Hunden einen extrem hohen Grad an Polymorphismen aufwies.

Die individuellen Allele von DLA-88 sind in Abb. 4.1 a bis c dargestellt. Signifikante Anzahlen von Polymorphismen wurden in allen drei Exons gefunden. Das Allel #1 ist die Referenzsequenz von D100, dem homozygoten Hund aus der Fred Hutchinson Zucht. Die meisten Positionen mit Veränderungen der Sequenz wurden schon in ähnlichen Studien beim Menschen und bei Mäusen beschrieben (Bjorkman et al., 1987a), das heißt, zwischen verschiedenen Spezies sind Polymorphismen an vielen Stellen konserviert. Auffallend ist, daß in fünf Allelen eine zusätzliche Aminosäure an Position 155 festzustellen war.

Allele	-24	-10	-1
#1	MEVVM	PRALLVLLS	AALAVTLTRA
#2	-----	-----	-----
#3	-----	-----	-----
#4	-----	-----	-----
#5	-----	-----	-----
#6	-----	-----	-----
#7	-----	-----	-----
#8	-----	-----	-----
#9	-----	-----	-----
#10	-----	-----	-----
#11	-----	-----	-----P-----
#12	-----	-----	-----
#13	-----	-----	-----
#14	-----	-----	-----
#15	-----	-----	-----
#16	-----	-----	-----
#17	-----	-----	-----
#18	-----	-----	-----
#19	-----	-----	-----
#20	-----	-----	-----
#21	-----	-----	-----
#22	-----	-----	-----
#23	-----	-----	-----
#24	-----	-----	-----
#25	-----	-----	-----
#26	-----	-----	-----
#27	-----	-----	-----
#28	-----	-----	-----
#29	-----	-----	-----
#30	-----	-----	-----
#31	-----	-----	-----
#32	-----	-----	-----
#33	-----	-----	-----P-----
#34	-----	-----	-----
#35	-----	-----	-----
#36	-----	-----	-----P-----
#37	-----	-----	-----
#38	-----	-----	-----
#39	-----	-----	-----
#40	-----	-----	-----W-----
#41	-----	-----	-----
#42	-----	-----	-----
#43	-----	-----	-----
#44	-----	-----	-----

Abb. 4.1 a Änderungen von Aminosäuren in Exon 1 von DLA-88

Gestrichelte Linien bedeuten identische Aminosäuren mit der Referenzsequenz von D100, Punkte zeigen Deletionen / Insertionen. Die Positionsangaben sind in Exon 1 negativ und in Exon 2 und 3 fortlaufend.

<u>Position</u>	<u>Änderung</u>	<u>Häufigkeit</u>
52	Val -> Met	1/18 (5,6%)
62	Pro -> Arg	1/18 (5,6%)

Abb. 4.2 Polymorphismen bei DLA-12.

4.3 DLA-64

Auch DLA-64 stellte sich als wesentlich weniger polymorph im Vergleich zu DLA-88 heraus. Die Analyse von 20 Hunden erbrachte nur zwei neue Allele. Eine geringe Anzahl weiterer Allele hätte sich bei den 20 Hunden finden lassen können, es wurden allerdings nur eine begrenzte Anzahl an Subklonen sequenziert. Die zwei neuen Allele wurden wie folgt charakterisiert: Allel #1 ist die Referenzsequenz von D100. In Allel #2 wurde die Aminosäure Leucin an Position -4 durch ein Proline ersetzt. Dieses Allel wurde in mehreren Hunden gefunden, während Allel #3 nur in einem Hund entdeckt wurde. Auch hier wurde ein Leucin durch ein Proline ersetzt, allerdings an Position -15 (Abb. 4.3). Wie in DLA-12 wurde auch bei DLA-64 eine Änderung der Referenzsequenz von D100 bemerkt. Alle untersuchten Hunde hatten einen Wechsel an Position 181 in Exon 3. Dort, wo man ein Arginin vermutete, fand sich ein Leucin. Die Resequenzierung von D100 erbrachte das gleiche Ergebnis.

<u>Position</u>	<u>Änderung</u>	<u>Häufigkeit</u>
-15	Leu -> Pro	1/22 (4,5%)
- 4	Leu -> Pro	5/22 (22,7%)

Abb. 4.3 Polymorphismen bei DLA-64

4.4 DLA-79

Im Falle DLA-79 wurden vier neue Allele entdeckt. Das erste Allel hatte einige charakteristische Veränderungen in der Aminosäuresequenz in Exons 2 und 3 (Abb. 4.4). An Position 73 tritt ein Phenylalanin an die Stelle von Valin, an Position 77 ein Methionin für Threonin und an Position 98 ein Isoleucin für Threonin. Des weiteren fand sich an Position 100 ein Alanin anstelle eines Valin. An Position 104 wurde ebenfalls ein Valin ersetzt durch ein Methionin. Schließlich zeigte sich noch eine Änderung bei Position 151,

wo ein Serin für ein Threonin stand. Dieses Allel wurde bei zwei Hunden verifiziert. Ein weiteres Allel, welches dieselben Änderungen mit einer zusätzlichen aufzeigte, wurde in einem Hund entdeckt. An Position 76 wurde ein Arginin durch ein Glycin ersetzt. Das letzte Allel wurde in vier Hunden ermittelt. In Exon 1 an Position -12 entfällt das Leucin. Des weiteren änderten sich an Position 33 das Phenylalanin zu einem Leucin und an Position 37 das Asparagin zu einer Asparaginsäure.

<u>Position</u>	<u>Änderung</u>	<u>Häufigkeit</u>
-12	Leu entfällt	4/22 (18,2%)
33	Phe -> Leu	4/22 (18,2%)
37	Asn -> Asp	4/22 (18,2%)
73	Val -> Phe	2/22 (9,1%)
76	Arg -> Gly	1/22 (4,5%)
77	Thr -> Met	2/22 (9,1%)
98	Thr -> Ile	2/22 (9,1%)
100	Val -> Ala	2/22 (9,1%)
104	Val -> Met	2/22 (9,1%)
151	Thr -> Ser	2/22 (9,1%)

Abb. 4.4 Polymorphismen bei DLA-79

Eine mögliche Einschränkung in dem Ansatz dieser Studie ist die Tatsache, daß als mögliche Fehlerquelle die Ergebnisse der PCR-Reaktionen fehlerhaft sein könnten. Tindall und Kunkel haben demonstriert, daß das Fehlen einer Fehlerkorrektur (Proofreading) der Taq-Polymerase häufig zu einzelnen Basenpaarenveränderungen oder sogar zum Wegfallen von Basenpaaren mit daraus folgendem Sprung im Leseraster führen kann (Tindall und Kunkel, 1988). In den Fällen von DLA-88 und DLA-64 war jedes einzelne Allel durch so viele Änderungen in der Sequenz charakterisiert, daß sie leicht durch erneute PCR und Sequenzierungen verifiziert werden konnten. Dazu wurden bis zu drei verschiedene PCR-Reaktionen angesetzt, welche dann unabhängig von einander ligiert und transformiert wurden. Bis zu acht individuelle Subklone jeder Transformation wurden dann sequenziert und analysiert. Die zwei Allele in DLA-12 wurden ebenfalls durch erneute PCR und Sequenzierung kontrolliert und verifiziert. Dadurch konnten Sequenzierungsartefakte durch Taq ausgeschlossen werden.

Bei den Untersuchungen von DLA-79 stellte sich die Verifizierung der gefundenen Allele mittels erneuter PCR als schwieriger bzw. ungenauer heraus, da die Allele sich teilweise in nur einem Basenpaaraustausch unterschieden. Daher wurden die PCR-Produkte mittels Einzel-Strang-Konformation-Polymorphismen (single-strand conformation polymorphism - SSCP) analysiert. Die dafür benötigten Primer setzten jeweils am Rande der Exons 2 und 3 an (Abb. 4.5).

Exon	Name	Sequenz	Länge
		5'	3'
2	c1sp 62	GAGGCTCAGCCTCTTGGC	18
2	c1sp 63	GGATGGCGACCTGGACC	17
3	c1sp 64	ACTTTCGTGCTGACACATCG	20
3	c1sp 65	AGTGAAGATGGGGAGGCC	18

Abb. 4.5 SSCP Primer bei DLA-79

Verschiedene Banden auf dem Gel entsprachen verschiedenen Allelen der einzelnen Exons. Die Banden wurden direkt aus dem nicht denaturierenden MDE Polyacrylamidgel herausgeschnitten, die DNA verdünnt und mit den gleichen Primern reamplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden direkt sequenziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verifizierten die Existenz von mindestens vier Allelen von DLA-79.

4.5 Vergleich zellulärer und molekularer Methoden für MHC-Typing

Es wurde postuliert, daß der DLA in drei serologisch definierte Gruppen aufgeteilt ist. DLA-A mit fünf Spezifitäten, DLA-B mit vier und DLA-C mit dreien (Bull et al., 1987). Eine vierte Gruppe, DLA-D, durch zehn Spezifitäten charakterisiert, wurde mit MLC (mixed lymphocyte/leucocyte cultures) analysiert (Deeg et al., 1986b). Diese serologischen Spezifitäten waren abhängig von der Reaktion der Hundelymphozyten mit verschiedenen Klasse I und II Antiseren in standardisierten Mikrolymphotoxizitätsassays (Bull et al., 1987). Bei diesen Studien fanden sich unter anderem neun homozygote Hunde. Diese neun Hunde, die sich zuvor bei MLC-Untersuchungen als homozygot erwiesen, wurden ebenfalls mit der PCR-Methode analysiert. Hierbei stellte sich heraus, daß einer dieser Hunde tatasächlich heterozygot für DLA-88 war, obwohl er zuvor als

homozygot beschrieben wurde. Es fanden sich bei ihm die Allele #5 und #33. Die übrigen acht Hunde zeigten auch bei den neuen PCR-Ergebnissen Homozygotie.

Diese Untersuchung zeigt, daß Typisierung über PCR genauer als herkömmliche Methoden ist und als schnellere Technik demnach die erste Wahl darstellt, wenn Klonierungsschritte nicht notwendig sind. Es würde sich für ein effizientes Typisierungsverfahren anbieten, PCR Enzyme mit Fehlerkorrektur zu verwenden, bei denen die Verifizierung durch Klonierung nicht mehr notwendig ist.

5. Diskussion

Die Knochenmarktransplantation ist eine bahnbrechende Entwicklung, für die Donall Thomas 1990 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Schon 1965 wurde diese Technik in *Nature* beschrieben, zunächst einmal als Therapieform für akute Leukämie (Thomas und Epstein, 1965). Im Laufe der Jahre zeigte sich, daß die Knochenmarktransplantation und später die Stammzelltransplantation noch weitaus mehr Erkrankungen bekämpfen können. Der Vorteil der Stammzelltransplantation besteht vor allem in der geringeren Belastung des Spenders, der die mühevollen und schmerzhaften Gewinnung des Knochenmarks aus den Beckenkämmen umgehen kann. Hinzu kommt die deutlich beschleunigte hämatopoetische Rekonstitution (Neutrophile und Thrombozyten) nach der Transplantation. Auch ist eine Retransplantation einfacher.

Das Hauptproblem ist jedoch die Abstoßreaktion. Diese kann sowohl vom Empfänger Knochenmark als auch vom Knochenmark des Donors ausgehen. Im ersten Fall nennt man dies Host versus Graft disease (HVGD). Das Immunsystem des Rezipienten reagiert auf die gespendeten Zellen und greift diese an, was sich durch verschiedene Symptome von leichtem Fieber bis hin zu Organversagen äußern kann. Durch Ganzkörperbestrahlung bzw. spezifische Bestrahlung einzelner Lymphknotenregionen versucht man, die HVGD auf ein Minimum zu reduzieren (Storb et al., 1999a). Ein weitaus gravierenderes Problem stellt die Graft versus Host disease (GVHD) dar. Das gespendete Knochenmark, insbesondere die T-Lymphozyten, greifen körperfremde Zellen an, in diesem Fall die Zellen des Empfängers. Durch die gezielte Gabe von Antimetaboliten wie zum Beispiel Mycophenolate Mofesil (MMF) und T-Zell-Inhibitoren wie Cyclosporin konnte nicht nur die Dosis der Bestrahlung vor der Transplantation verringert, sondern auch das Ausmaß der GVHD erniedrigt werden (Storb et al., 1999c).

Abstoßungsreaktionen wie GVHD basieren auf Selbst-/Nichtselbsterkennung von Gewebe. Dieses Phänomen wird hervorgerufen durch T-Lymphozyten, die die Körperzellen abtasten und auf molekularer Ebene erkennen, ob es sich um körperfremde oder körpereigene Zellen handelt. Dies erfolgt über Oberflächenrezeptoren, die auf allen somatischen Zellen exprimiert werden. Die Gene, die diese Rezeptoren codieren, liegen im Major Histokompatibilitäts-Komplex, der in drei Klassen untergliedert ist. Die Klassen I und 2 sind für die zelluläre und humorale Immunantwort zuständig. Daher wäre es sinnvoll, die in beiden Klassen codierten, für die Immunabwehr verantwortlichen Gene in ein Typisierungssystem einzubeziehen.

In dieser Arbeit wurden die bis dato bekannten, strukturell kompletten Klasse I-Gene auf Polymorphismen hin untersucht, um unter anderem Hinweise zu erlangen, welches dieser Gene als Klasse Ia-Gen, d. h. das den Rezeptor codierende Gen, in Frage kommen könnte. Aus den Untersuchungen in dieser Arbeit kann geschlossen werden, daß es sich bei DLA-88 um den tatsächlichen Klasse I Rezeptor handeln muß (Graumann et al., 1998).

Die größte Anzahl an Variationen wurde bei DLA-88 gefunden. Viele dieser Polymorphismen sind an den Stellen des Genes entdeckt worden, die schon bei früheren Untersuchungen am Menschen oder am Baboon als hochgradig polymorph beschrieben wurden (Arnett und Parham, 1995) (Prilliman et al., 1996). Zum Beispiel die Aminosäuren 9, 95, 97, 114 und 116, die alle in dem zentralen Beta-Blatt liegen und in die Peptide Binding Region (PBR) ragen, sind sehr polymorph im Menschen als auch im Hund. Die Aminosäuren an diesen Lokalisationen interagieren mit den Antigenen, die an den Rezeptor binden (Bjorkman et al., 1987a). Die α 1-Helix erwies sich als wesentlich vielgesichtiger als die α 2-Helix in dem Gen DLA-88 (Abb. 5.2). Auch diese Tatsache wurde beim entsprechenden menschlichen Gen beobachtet. Besonders bemerkenswert ist, daß in mindestens fünf Allelen von DLA-88 im Hund eine zusätzliche Aminosäure an Position 155 in der α 2-Helix zu finden ist. Dort wurde ein Histidin ersetzt durch ein Leucin und ein Glutamin (grün markiert in Abb. 5.2). Im menschlichen korrespondierenden Gen ist die Aminosäure an Position 155 ein potentieller Ligand für Antigene in der PBR (Bjorkman et al., 1987a).

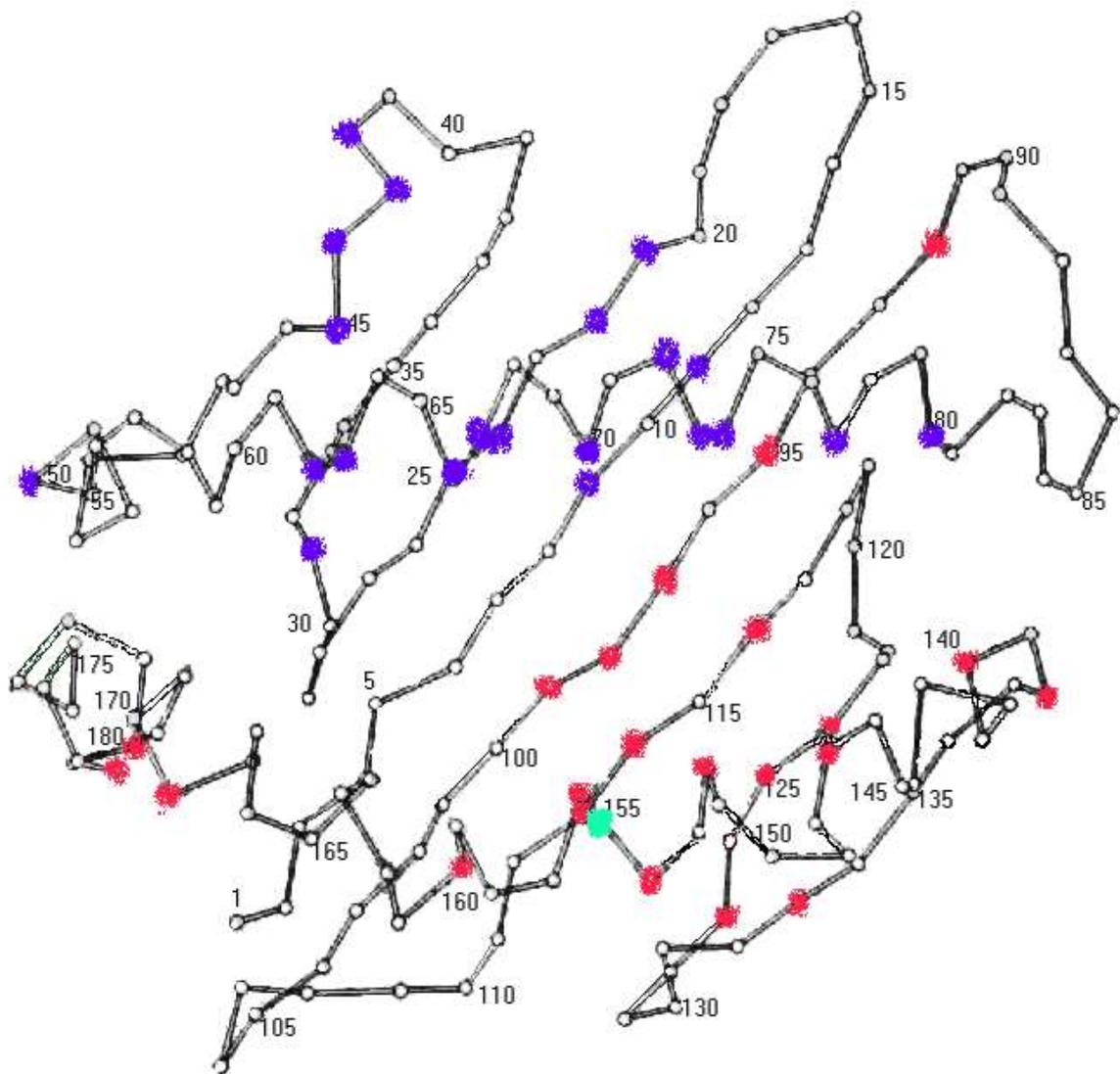


Abb. 5.2 Klasse I Rezeptor. Schematische und modifizierte Zeichnung des HLA-A2 Rezeptors (Bjorkman et al., 1987a), Ansicht der Peptide binding Region von oben. Blau markierte Stellen sind in zwei und mehr Allelen vom zweiten Exon von DLA-88 in dieser Arbeit variabel. Rot gekennzeichnete Positionen sind in zwei und mehr Allelen polymorphe Aminosäuren im dritten Exon. Die grün markierte Aminosäure an Position 155 ist in fünf der gefundenen Allele durch zwei andere Aminosäuren ersetzt worden.

Des weiteren muß festgestellt werden, daß für eine korrekte Typisierung immer beide Exons, Exon zwei und drei, von DLA-88 sequenziert werden müssen, um das genaue Allel bestimmen zu können, da manche Allele sich nur durch einen Basenaustausch in einem Exon unterscheiden.

Die Ergebnisse bei den Untersuchungen von DLA-88 lassen nicht darauf schließen, wie viele Allele es insgesamt von diesem Gen geben mag, da bei 40 der untersuchten Hunde nur je ein Allel gefunden wurde. Von den übrigen 23 Hunden wurden ausreichend viele Subklone sequenziert, so daß jeweils beide Allele identifiziert werden konnten. Obwohl das wirkliche Ausmaß an Polymorphismen in dieser oder einer anderen Hundepopulation noch nicht bekannt ist, kann man aufgrund der großen Anzahl an gefundenen Allelen in einer kleinen Gruppe von Hunden schlußfolgern, daß DLA-88 ein klassisches Transplantationsantigen codiert.

Zuvor wurde vermutet, daß DLA-64 ebenfalls wie DLA-88 ein Klasse Ia Gen codiert (R. Burnett, unveröffentlichte Beobachtungen). Beim Menschen haben alle Klasse Ia Gene die gleiche Leadersequenz. Das ist auch bei DLA-64 und DLA-88 der Fall. Bei beiden Genen wurden Allele entdeckt, in denen das Leucin an Position -4 durch ein Prolin ersetzt ist. Des weiteren teilen einige Allele von DLA-88 über lange Strecken die gleiche Sequenz mit DLA-64. Allerdings ist eines der wichtigsten Charakteristika eines Klasse Ia Gens der hohe Grad an Polymorphismen (Nowak et al., 1992). In dieser Analyse zeigte sich jedoch, daß DLA-64 in 20 Hunden nur drei Allele aufweist und daher wahrscheinlich ein Klasse Ib-Gen darstellt.

Anhand der Ergebnisse dieser Studie, insbesondere unter dem Kriterium signifikanter Polymorphismen, kann nur eines der vier strukturell intakten DLA-Gene, DLA-88, als typisches Klasse Ia Gen bezeichnet werden. DLA-79 wurde schon zuvor als Klasse Ib Gen identifiziert (Burnett und Geraghty, 1995) und basierend auf den Daten, die in dieser Studie gewonnen wurden, können DLA-12 und -64 auch als Klasse Ib Gene klassifiziert werden (Shawar et al., 1994) (Geraghty, 1993). Diese Polymorphismus-analyse zeigte eine klare Rangfolge der Klasse I Gene im Hund auf, an deren erster Stelle DLA-88 steht. Im Hinblick auf Transplantationen und Histokompatibilitäts-Tests ist damit nun DLA-88 in den Vordergrund gerückt, um geeignete Spender und Empfänger zu finden (Graumann et al., 1998).

Insbesondere muß hervorgehoben werden, daß es sich bei der Analyse von Polymorphismen mittels PCR und Sequenzierung um eine zeit- und kostenaufwendige, aber sehr genaue Methode handelt. Die bei der Untersuchung mit MLC (mixed lymphocyte culture) beschriebenen homozygoten Hunde waren tatsächlich nicht alle

homozygot, wie sich bei der Analyse mit PCR herausstellte. Einer der neun untersuchten Hunde wies die Allele #5 und #33 auf. Daraus kann man schließen, daß die molekularen Assays im Hinblick auf den DLA-Status genauer sind als die zellulär basierten MHC-Assays.

Einen Überblick auf die derzeitige Situation in bezug auf den MHC im Hund liefert Tabelle 5.1.

Name des Gens	Gentyp	Klasse	Anzahl der Allele	Anzahl der Hunde
DLA-88	Komplett	Ia	48	103
DLA-64	Komplett	Ia oder b	3	20
DLA-79	Komplett	Ib	11	40
DLA-12	Komplett	Ia oder b	2	20
DLA-53	Pseudo	I		
DLA-12a	Pseudo	I		
DLA-DRA	Komplett	II	1	15
DLA-DRB1	Komplett	II	24	150
DLA-DRB2	Pseudo	II		
DLA-DQA	Komplett	II	9	60
DLA-DQB1	Komplett	II	20	70
DLA-DQB2	Pseudo	II		

Tab. 5.1 Namen und Klassenzuordnung der bisher bekannten MHC-Gene im Hund mit den entsprechenden Allelen und untersuchten Hunden (Burnett et al., 1997; Burnett und Geraghty, 1995; Wagner et al., 1996a; Wagner et al., 1999; Wagner et al., 1996c; Wagner et al., 2000; Wagner et al., 1995b; Wagner et al., 1998; Graumann et al., 1998)

Bei einer idealen Transplantation würde das Immunsystem des Empfängers niemals die Zellen des Spenders als fremd erkennen und umgekehrt. Bisher kann dies im Idealfall nur bei monozygoten Zwillingen erreicht werden. Bei allen übrigen Transplantationen, insbesondere Konchenmarktransplantationen, kann eine GVHD oder eine Transplantat-abstoßung erwartet werden, falls Spender und Empfänger mittels modernster Technik bei den Untersuchungen des MHC nicht als kompatibel bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Polymorphismusanalyse werden dazu beitragen, ein molekulares Typisierungssystem für den Hund zu entwickeln. Ein solches System wird unsere Kenntnis über den MHC erweitern und das Verständnis seiner Funktionen erleichtern. Letzten Endes sollte ein Typisierungssystem erstellt werden, das beide, Klasse I und Klasse II des MHC, gleichzeitig berücksichtigt. Dies soll ermöglichen, die am besten geeigneten Spender und Empfänger für Knochenmark- und Organtransplantationen möglichst schnell und effizient zu ermitteln. Um dieses Ziel zu erreichen, werden weiterhin *in vivo* und *in vitro* Studien

benötigt, die auf physikalisches Mapping, Charakterisieren und die Expression der MHC-Gene im Hund abzielen. In der Zwischenzeit werden die in dieser Analyse gewonnenen Daten in neue Protokolle inkorporiert, um Spender und Empfänger für präklinische Studien von Transplantationen zu ermitteln.

Die Allele von DLA-88 sind in der Zwischenzeit in die nicht menschliche Sektion der IMGT/HLA Datenbank integriert worden. Das ISAG DLA Nomenklatur Committee traf sich während der „Comparative Evolution of the Mammalian MHC“ Meeting in Manchester, England, am 10. September 2000. Der Hauptdiskussionspunkt war die Benennung der Klasse I-Gene und Allele mit der Einbeziehung von Allelen anderer mit dem Hund verwandter Spezies, wie roter und grauer Wolf und Kojote. Solange die Informationen noch nicht im Internet zur Verfügung stehen, können die Sequenzen und Namen via Email unter Lorna.Kennedy@man.ac.uk angefordert werden.

Alternativ zu der in dieser Arbeit beschriebenen Methode der Typisierung wurde eine SSCP-Typisierung entwickelt (Wagner et al., 2000). Hierbei werden zunächst die Exons zwei und drei mittels PCR amplifiziert, radiomarkiert und auf ein SSCP-Gel geladen. Dann wird, wie oben beschrieben, die gesamte Region um die ersten drei Exons von DLA-88 mit den Primern 16285'L und 1628i3' amplifiziert. Da dieses Produkt (~900 bp) zu groß für ein SSCP-Gel war, nahm man das Produkt als Grundlage für eine weitere PCR-Reaktion mit Primern, die in der Mitte von Exon zwei und drei lagen. Die resultierende 350 bp große Probe wurde dann radiomarkiert und ebenfalls auf ein SSCP-Gel geladen. Anhand der gesamten Ergebnisse ist der Untersucher in der Lage, die Exons einander zuzuordnen. Ein Vorteil der neuen Methode, sie dauert ungefähr drei Tage, ist die Zeitersparnis. Man benötigt keine langen Inkubationszeiten bei den Transformationen und, sofern keine neuen Allele genau analysiert werden müssen, entfallen auch die Sequenzierungen. Allerdings sind viele PCR-Reaktionen vonnöten, die sehr arbeitsaufwendig sind. Ein weiteres Problem stellte die Lokalisation des Primers im dritten Exon dar, da sich die meisten Polymorphismen am 3'-Ende befinden, die Positionierung eines Primers dort aber zu große Produkte für ein SSCP-Gel liefern würde. Außerdem fanden sich auf den Gelen oft mehr als zwei Banden, die konsequent sequenziert wurden. Es zeigten sich pro Hund in jedem Fall nur zwei Allele. Oft, in 20% der Fälle, konnte man die Exons einander nicht zuordnen, so daß in diesen Fällen ebenfalls herkömmlich kloniert und sequenziert werden mußte.

In den letzten Jahren wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rainer Storb ein neues Behandlungskonzept entwickelt, welches ermöglicht, Hunde bzw. Patienten mit sogenanntem chimären Knochenmark zu erzeugen (Storb, 1998). Das heißt, die

Transplantierten besitzen körpereigenes und körperfremdes Knochenmark zur gleichen Zeit, ohne daß es zu Abstoßreaktionen kommt. Dies wird durch eine low-dose Bestrahlung des Empfängers vor der Transplantation und anschließend an die Transplantation durch die kombinierte Gabe von Mycophenat Mofetil und Cyclosporin erreicht. Bei diesem Konzept spielt eine subklinische Form der GVHD eine wichtige Rolle. Die gespendeten Zellen schaffen sich selbst neben dem alten Knochenmark Platz, wodurch die Bestrahlung vor der Transplantation deutlich verringert werden kann. Die Immunsuppression nach Transplantation etabliert gegenseitige Spender-Empfänger-Toleranz, durch die sich eine stabile Form eines hämatopoetischen Chimäres manifestiert. Präklinische und klinische Studien haben bereits erste Erfolge gezeigt. Bei Patienten mit T-Zell-Immundefizienzen konnten ohne vorangehende Konditionierung gemischte Chimäre erzeugt werden. Es gibt bereits Daten über mehr als 400 Patienten mit hämatologischen, malignen Erkrankungen, die ambulant erfolgreich behandelt wurden und chimäres Knochenmark aufweisen. In den meisten Patienten verwandelt sich der anfängliche gemischte Chimerismus in einen kompletten Donor-Chimerismus, und die Mehrzahl der transplantierten Patienten erfährt später eine komplette Remission ihrer malignen Erkrankungen (Walters, M. C. et al., 2001).

Ein Knochenmark-Chimerismus hat auch eine Perspektive in der Gentherapie, wenn zum Beispiel das „Insulin“-Gen in Stammzellen exprimiert wird, zur Behandlung von Diabetes mellitus. In jedem Fall aber ist die MHC-Typisierung Grundlage für eine erfolgreiche Transplantation.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten stellen einen wichtigen Schritt in der Typisierung des DLA-Komplexes des Hundes dar, der als Modell für die Behandlung durch Knochenmarktransplantation beim Menschen etabliert ist. In der Arbeit wurde gezeigt, daß DLA-88 ein klassisches Klasse I Transplantationsgen darstellt, im Gegensatz zu den drei weiteren untersuchten Genen DLA-12, -79 und -64. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der PCR-Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung war genauer als herkömmliche Typisierungstechniken, was durch die erneute Untersuchung von neun bereits typisierten Hunden gezeigt wurde. Diese waren in der Vergangenheit alle als homozygot beschrieben worden. Jetzt stellte sich jedoch heraus, daß einer von ihnen heterozygot für DLA-88 war.

Durch die neuen Erkenntnisse über den Major Histokompatibilitätskomplex des Hundes, die durch diese Arbeit erweitert wurden, ist nun der Grundstein gelegt worden für ein neues System, um geeignete Spender und Empfänger für Transplantationen zu suchen.

Dieses wird in Zukunft schneller und effektiver möglich sein, wodurch unter anderem auch die Nebenwirkungen minimiert werden können.

6. Literatur

Arnett, K. L., und Parham, P. (1995). HLA class I nucleotide sequences, 1995, *Tissue Antigens* 46, 217-57.

Bell, G. I., Karam, J. H., und Rutter, W. J. (1981). Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5759-63.

Bensinger, W. I., und Storb, R. (2001). Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, *Rev Clin Exp Hematol* 5, 67-86.

Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., und Wiley, D. C. (1987a). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens, *Nature* 329, 512-8.

Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., und Wiley, D. C. (1987b). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature* 329, 506-12.

Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., und Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature* 364, 33-9.

Bull, R. W., Vriesendorp, H. M., Cech, R., Grosse-Wilde, H., Bijma, A. M., Ladiges, W., Krumbacher, K., Doxiadis, I., Ejima, H., Templeton, J., *et al.* (1987). Joint report of the third international workshop on canine immunogenetics. II. Analysis of the serological typing of cells, *Transplantation* 43, 154-161.

Burnett, R. C., DeRose, S. A., Wagner, J. L., und Storb, R. (1997). Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene, *Tissue Antigens* 49, 484-95.

Burnett, R. C., und Geraghty, D. E. (1995). Structure and expression of a divergent canine class I gene, *J Immunol* 155, 4278-85.

Deeg, H. J., Raff, R. F., Grosse-Wilde, H., Bijma, A. M., Buurman, W. A., Doxiadis, I., Kolb, H. J., Krumbacher, K., Ladiges, W., Losslein, K. L., und *et al.* (1986a). Joint report of the Third International Workshop on Canine Immunogenetics. I. Analysis of homozygous typing cells, *Transplantation* 41, 111-7.

Deeg, H. J., Raff, R. F., Grosse-Wilde, H., Bijma, A. M., Buurman, W. A., Doxiadis, I., Kolb, H. J., Krumbacher, K., Ladiges, W., Losslein, K. L., *et al.* (1986b). Joint report of the third international workshop on canine immunogenetics. I. Analysis of homozygous typing cells, *Transplantation* 41, 111-117.

Deeg, H. J., and Storb, R. (1994). Canine marrow transplantation models, *Curr Top Vet Res* 1, 103-114.

Dessen, A., Lawrence, C. M., Cupo, S., Zaller, D. M., and Wiley, D. C. (1997). X-Ray Crystal Structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) Complexed with a Peptide from Human Collagen II, *Immunity* 7, 473-481.

Doxiadis, I., Krumbacher, K., Neefjes, J. J., Ploegh, H. L., and Grosse-Wilde, H. (1989). Biochemical evidence that the DLA-B locus codes for a class II determinant expressed on all canine peripheral blood lymphocytes, *Exp Clin Immunogenet* 6, 219-24.

Dutra, A. S., Mignot, E., and Puck, J. M. (1996). Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog, *Cytogenet Cell Genet* 74, 113-7.

Epstein, R. B., Storb, R., Ragde, H., and Thomas, E. D. (1968). Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs, *Transplantation* 6, 45-58.

Friedman, L. S., Ostermeyer, E. A., Szabo, C. I., Dowd, P., Lynch, E. D., Rowell, S. E., und King, M. C. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families, *Nat Genet* 8, 399-404.

Geraghty, D. E. (1993). Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes, *Curr Opin Immunol* 5, 3-7.

Graumann, M. B., DeRose, S. A., Ostrander, E. A., Storb, R. (1998). Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes, *Tissue Antigens* 51, 374-381.

Guillet, J. G., Lai, M. Z., Briner, T. J., Buus, S., Sette, A., Grey, H. M., Smith, J. A., und Geftter, M. L. (1987). Immunological self, nonself discrimination, *Science* 235, 865-70.

Klein, J. (1986) *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*, Wiley, New York.

Ladiges, W. C., Storb, R., and Thomas, E. D. (1990). Canine models of bone marrow transplantation, *Lab Anim Sci* 40, 11-5.

Matthews, D. C., Appelbaum, F. R., Eary, J. F., Fisher, D. R., Durack, L. D., Hui, T. E., Martin, P. J., Mitchell, D., Press, O. W., Storb, R., und Bernstein, I. D. (1999). Phase I study of (131)I-anti-CD45 antibody plus cyclophosphamide and total body irradiation for advanced acute leukemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 94, 1237-47.

Nedospasov, S. A., Udalova, I. A., Kuprash, D. V., und Turetskaya, R. L. (1991). DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene, *J Immunol* 147, 1053-9.

Nowak, M. A., Tarczy-Hornoch, K., und Austyn, J. M. (1992). The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10896-9.

Prilliman, K., Lawlor, D., Ellexson, M., McElwee, N., Confer, D., Cooper, D. K. C., Kennedy, R. C., und Hildebrand, W. (1996). Characterization of baboon class I major histocompatibility molecules, *Transplantation* 61, 989-996.

Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I., und Storb, R. (1992). Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA, *Immunogenetics* 35, 416-20.

Sarmiento, U. M., DeRose, S., Sarmiento, J. I., und Storb, R. (1993). Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQB, *Immunogenetics* 37, 148-52.

Sarmiento, U. M., Sarmiento, J. I., und Storb, R. (1990). Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex, *Immunogenetics* 32, 13-9.

Sarmiento, U. M., und Storb, R. (1990). Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone, *Immunogenetics* 31, 400-4.

Sarmiento, U. M., und Storb, R. F. (1988a). Characterization of class II alpha genes and DLA-D region allelic associations in the dog, *Tissue Antigens* 32, 224-34.

Sarmiento, U. M., und Storb, R. F. (1988b). Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog, *Immunogenetics* 28, 117-24.

Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R., und Rich, R. R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules, *Annu Rev Immunol* 12, 839-80.

Storb, R. (1998). *Hematology* (Washington DC, American Society of Hematology).

Storb, R. (1999). In: Perry MC (ed): *ASCO Education Book*, 241.

Storb, R., Deeg, H. J., Raff, R., Schuening, F., Yu, C., Sandmaier, B. M., und Graham, T. (1995). Prevention of graft-versus-host disease. Studies in a canine model, *Ann N Y Acad Sci* 770, 149-64.

Storb, R., Epstein, R. B., Bryant, J., Ragde, H., und Thomas, E. D. (1968). Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing, *Transplantation* 6, 587-93.

Storb, R., Epstein, R. B., Ragde, H., Bryant, J., und Thomas, E. D. (1967). Marrow engraftment by allogeneic leukocytes in lethally irradiated dogs, *Blood* 30, 805-11.

Storb, R., McSweeney, P. A., Sandmaier, B. M., Nash, R. A., Georges, G., Maloney, D. G., Molina, A., Chauncey, T., Yu, C., Zaucha, J. M., *et al.* (2000). Allogeneic hematopoietic

stem cell transplantation: from the nuclear age into the twenty-first century, *Transplant Proc* 32, 2548-9.

Storb, R., Yu, C., Barnett, T., Wagner, J. L., Deeg, H. J., Nash, R. A., Kiem, H. P., McSweeney, P., Seidel, K., Georges, G., und Zaucha, J. M. (1999a). Stable mixed hematopoietic chimerism in dog leukocyte antigen-identical littermate dogs given lymph node irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplantation, *Blood* 94, 1131-6.

Storb, R., Yu, C., und McSweeney, P. (1999b). In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (ed): *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2nd ed. Boston: Blackwell Science,, 287.

Storb, R., Yu, C., Zaucha, J. M., Deeg, H. J., Georges, G., Kiem, H. P., Nash, R. A., McSweeney, P. A., und Wagner, J. L. (1999c). Stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given donor antigen, CTLA4Ig, and 100 cGy total body irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplant, *Blood* 94, 2523-9.

Theobald, M., und Storb, R. (1997). Transplantation von Knochenmark und peripheren Stammzellen, *Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis 4th Edition*, 661-674.

Thomas, D. E. (1996). A brief review of bone marrow transplantation. Paper presented at: 26th Congress of the International Society of Haematology (Singapore).

Thomas, E. D., und Epstein, R. B. (1965). Bone marrow transplantation in acute leukemia, *Cancer Res* 25, 1521-4.

Thomas, E. D., Storb, R., und Epstein, R. B. (1970). Bone marrow chimeras in man and animals, *Hamatol Bluttransfus* 9, 86-95.

Tindall, K. R., und Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Biochemistry* 27, 6008-13.

Tiwari, J., und Terasaki, P. (1985). HLA and Disease Association.

Todd, J. A., Acha-Orbea, H., Bell, J. I., Chao, N., Fronck, Z., Jacob, C. O., McDermott, M., Sinha, A. A., Timmerman, L., und Steinman, L., et al. (1988). A molecular basis for MHCclass II-associated autoimmunity, *Science* 240, 1003-1009.

Townsend, A., und Bodmer, H. (1994). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 7, 601.

Vriesendorp, H. M., Grosse-Wilde, H., und Dorf, M. E. (1977). The major histocompatibility system in the dog, Gotze, D., ed *The Major Histocompatibility System in Man and Animal* New York: Springer-Verlag, 129-163.

Wagner, J. L., Burnett, R. C., DeRose, S. A., und Storb, R. (1996a). Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene, *Tissue Antigens* 48, 199-204.

Wagner, J. L., Burnett, R. C., und Storb, R. (1996b). Molecular analysis of the DLA DR subregion, *Tissue Antigens* 48, 549-553.

Wagner, J. L., Burnett, R. C., und Storb, R. (1999). Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives, *J Hered* 90, 35-8.

Wagner, J. L., Burnett, R. C., Works, J. D., und Storb, R. (1996c). Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism, *Tissue Antigens* 48, 554-561.

Wagner, J. L., Creer, S. A., und Storb, R. (2000). Dog class I gene DLA-88 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing, *Tissue Antigens* 55, 564-7.

Wagner, J. L., DeRose, S. A., Burnett, R. C., und Storb, R. (1995a). Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones, *Tissue Antigens* 45, 284-7.

Wagner, J. L., DeRose, S. A., Burnett, R. C., und Storb, R. (1995b). Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones, *Tissue Antigens* 45, 284-287.

Wagner, J. L., Hayes-Lattin, B., Works, J. D., und Storb, R. (1998). Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQB genes, *Tissue Antigens* 52, 242-250.

Walters, M. C., Patience, M., Leisenring, W., Eckman, J. R., Scott, J. P., Mentzer, W. C., Davies, S. C., Ohene-Frempong, K., Bernaudin, F., Matthews, D. C., *et al.* (1996). Bone marrow transplantation for sickle cell disease, *N Engl J Med* 335, 369-76.

Walters, M. C., Patience, M., Leisenring, W., Rogers, Z. R., Aquino, V. M., Buchanan, G. R., Roberts, I. A., Yeager, A. M., Hsu, L., Adamkiewicz, T., Kurtzberg, J., Vichinsky, E., Storer, B., Storb, R., Sullivan, K. M. (2001). Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia, *Biol Blood Marrow Transplant* 7 (12), 665-73.

Wucherpfennig, K. W., und Strominger, J. L. (1995). Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases, *Exp Med* 181, 1597-1601.

7. Zusammenfassung

Knochenmarktransplantationen werden heutzutage zur Behandlung vieler maligner und nicht maligner Krankheiten eingesetzt. Erkranktes Knochenmark wird entweder durch Bestrahlung oder durch Immunsuppressiva zerstört bzw. geschwächt. Anschließend wird von einem histokompatiblen Spender Knochenmark, inzwischen auch Stammzellen aus peripherem Blut, gewonnen und transplantiert oder infundiert, um ein intaktes Immunsystem wieder herzustellen und um die verbliebenen erkrankten Zellen zu zerstören. Dabei kommt es immer wieder zu Abstoßungsreaktionen. Diese resultieren aus der Tatsache, daß entweder Zellen des Donors oder die des Rezipienten auf die fremden Zellen reagieren und diese angreifen. Durch genetische Informationen, die im Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) codiert sind, erkennen die Lymphozyten andere Zellen als körpereigen oder körperfremd. Als Grundlage für die Vielzahl von Behandlungsschemata dient vor allem das Wissen um den MHC, seine Aufgaben und Funktionen. Die Gene, die in den verschiedenen Klassen des MHC codiert werden, sind verantwortlich für die Präsentation von Antigenen an den Rezeptoren der einzelnen Klassen des MHC auf bestimmten Zelloberflächen. Der menschliche HLA-Komplex und der des Hundes haben einen hohen Grad an Übereinstimmungen in bezug auf ihre genetische Struktur und Sequenz. Daher wird der Hund als Modell sowohl für die vorklinische Forschung an Knochenmark- und Stammzelltransplantationen als auch für human- und veterinärmedizinische Zwecke genutzt, wozu molekulare Informationen über den MHC (im Hund DLA: dog leukocyte antigen) unabdingbar sind. Der DLA wurde zunächst auf zellulärer und serologischer Ebene untersucht. Zur Zeit erfolgen molekulare Untersuchungen der einzelnen Untergruppen des DLA.

In dieser Studie wurde die Variabilität vierer strukturell vollständiger Leukozyten-Antigene im Hund analysiert. Die Gene wurden durch Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, kloniert und sequenziert, und wurden mit DLA-12, -88, -79 und -64 betitelt. Es sind noch drei weitere Gene in der Klasse I des MHC im Hund bekannt, wobei es sich im Fall von clpg26 um ein prozessiertes Gen und bei DLA-12a und -53 um zwei unvollständige Gene handelte. Interessant für diese Studie waren jedoch nur die vier strukturell intakten Gene. Es wurden hauptsächlich nicht verwandte und nicht reinrassige Hunde, aber auch einige bisher als DLA-homozygot beschriebene Hunde für diese Analyse verwendet. Die Untersuchung beschränkte sich auf die ersten drei Exons der vier Gene, da diese in den entsprechenden menschlichen Genen den höchsten Grad an Polymorphismen zeigten. Es stellte sich heraus, daß DLA-88 mit 44 Allelen in insgesamt

63 nicht verwandten Hunden verschiedenster Rassen weitaus polymorpher war als die drei anderen Gene. Des weiteren ist bemerkenswert, daß die Positionen der polymorphen Aminosäuren vorwiegend im Bereich der Peptid-Binde-Region des Rezeptors liegen, also dort, wo Antigene andocken und präsentiert werden. Die übrigen Gene DLA-12, -79 und -64 wiesen zwischen einem und vier Allelen in insgesamt 25 analysierten Hunden auf. Vor allem war bei den Ergebnissen bemerkenswert, daß in fünf Allelen bei DLA-88 eine zusätzliche Aminosäure zu finden war und daß ein früher als homozygot beschriebener Hund sich nun für DLA-88 als heterozygot herausstellte. Diese Arbeit war Teil des Bestrebens, ein molekulares MHC-Typing System für Hunde zu entwickeln, welches für zukünftige Forschung in vorklinischen Studien von hämatopoetischen Stammzell- und Organtransplantationen im Hundemodell von großer Bedeutung ist.

8. Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

Graumann, M.B., DeRose, S.A., Ostrander, E.A. und Storb, R. (1998): Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes. *Tissue Antigens*: **51**: 374-381.

9. Lebenslauf

Michael Benjamin Graumann

geboren am 12.04.1973 in Krefeld als Sohn von Volker und Dorothea Graumann

1979.1983	Grundschule Südschule, Krefeld
1983.1992	Arndt-Gymnasium Krefeld
1992	Abitur
1992.2000	Humanmedizin-Studium an der Philipps-Universität Marburg
1995-1997	Forschung am Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA
2000.2001	Praktisches Jahr am St. Marienkrankenhaus Siegen
2001	Drittes Staatsexamen
2001.2002	AiP am Südholstein Klinikum Bad Segeberg
2002-2004	Assistenzarzt Klinik Preetz
2004-	Assistenzarzt Klinikum Bremerhaven Reinkenheide

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren
Universitätsprofessoren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Christiansen, Engel, Eschenbach, Feuser,
Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gudde, Habermehl, Happle,
Hesse, Huffmann, Kälble, Kern, Klenk, Korz, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lennartz,
Maisch, Maser, Minne, Moll, Oertel, Remschmidt, Renz, Schachtschabel, Schäfer,
Schneyer, Schulz, Schumacher, Seifart, Steininger, Stinner, Strunk, Thomas, Werner

11. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rainer Storb, ohne den diese Arbeit gar nicht erst möglich gewesen wäre. Er ermöglichte mir, die Forschung für diese Arbeit in Seattle im Fred Hutchinson Cancer Research Center durchzuführen.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Diethard Gemsa, der sich bereit erklärte, mein Doktorvater zu sein, und mich bei der Formulierung der Arbeit sehr unterstützte.

Besonderer Dank gilt der Laborgruppe in Seattle, insbesondere Susan DeRose, Robert Burnett, Jim Works, Cong Yu und John Wagner, die mir bei der praktischen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch Michelle Fisher und Brett Thayer danke ich für die Unterstützung während meiner Zeit in Seattle.

Für die Hilfe bei der Publikation meines Artikels in *Tissue Antigen* danke ich neben Prof. Rainer Storb und Susan DeRose auch Elaine Ostrander.

Bei der Korrektur halfen Prof. Dr. D. Gemsa, Dorothea Graumann, Peter Graumann und Birte Hennings. Vielen Dank.

Vor allem möchte ich meiner ganzen Familie danken. Insbesondere für Ihr Engagement und Ihre Unterstützung danke ich Birte Hennings, aber auch meiner Mutter Dorothea Graumann, meinem Bruder Peter Graumann und seiner Frau Tina, meinen Nichten und Neffen Lea, Gerrit und Peer und Tante Ute Graumann, den Familien Beyer, Ellinghaus, Schlüter und Storb.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Polymorphismusanalyse von vier Klasse I Genen im Hund* am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, Washington, USA, unter Leitung von Prof. Dr. Rainer Storb ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, April 2005