

**DIE HUMANE KOMPLEMENTFAKTOR H-GENFAMILIE:
ORGANISATION, STRUKTUR UND EXPRESSION**

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

ASTRID CANNICH

aus München

Juni 1999

Erstgutachter: Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolf Gutensohn
Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	7
1.1	Das Komplementsystem	7
1.1.1	Der MBL-Weg	8
1.1.2	Der alternative Komplementaktivierungsweg	9
1.1.3	Der klassische Komplementaktivierungsweg	10
1.1.4	Der Membranangriffskomplex (MAC)	10
1.2	Regulation der Komplementaktivierung	13
1.2.1	Regulation des klassischen Komplementweges und des MBL-Weges	13
1.2.2	Regulation des alternativen Komplementweges	14
1.2.3	Regulation des MAC	14
1.3	Faktor H und die Faktor H-Familie	15
1.3.1	Faktor H	15
1.3.1.1	Funktion von Faktor H	15
1.3.1.2	Struktur von Faktor H	17
1.3.1.3	Struktur, Expression und Regulation des Faktor H-Gens (HF1)	18
1.3.2	Die Faktor H-Familie	19
1.3.2.1	Struktur der FHRP	20
1.3.2.2	Mögliche Funktionen der FHRP	21
1.3.2.3	Regulation und Expression der Gene HF2- 5	22
1.4	Die Genetik des Komplementsystems	22
1.4.1	Genetische Lokalisation und Genstruktur wichtiger Komplementfaktoren	23
1.4.2	Charakteristika der Gene und der betreffenden Proteine des RCA-Komplexes	23
1.5	Komplementaktivierung und pathologische Prozesse	26
1.5.1	Komplementmangel-Syndrome	26
1.5.2	Komplement und Krankheiten	27
1.5.2.1	Komplement und rheumatische Arthritis (RA)	27
1.5.2.2	Komplement und Krankheiten des zentralen Nervensystems	29
1.5.2.2.1	Komplement und Multiple Sklerose	30
1.5.2.2.2	Komplement und Alzheimer	31
2	Zielsetzung der Arbeit	32
2.1	genomische Organisation der Faktor H-Genfamilie	32
2.2	Deletionen und Genorganisation der Gene HF2 und HF3	32
2.3	Expression der Faktor H-Genfamilie im Gehirn und in Gliomazelllinien	33
3	Material	34
3.1	Abkürzungen	34
3.2	Geräte	36
3.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	36
3.4	Kits	38

3.5	Enzyme	38
3.5.1	Restriktionsenzyme	38
3.5.2	Sonstige Enzyme	39
3.6	Oligonukleotide und PCR-Bedingungen	39
3.6.1	Oligonukleotide zur PCR-Amplifizierung von HF1-Sequenzen	39
3.6.2	Oligonukleotide zur PCR-Amplifizierung von HF2-Sequenzen	40
3.6.3	Oligonukleotide zur Amplifizierung von HF3-Sequenzen	40
3.6.4	Oligonukleotide zur Amplifizierung von HF4 und HF5-Sequenzen	40
3.6.5	Oligonukleotide zur Amplifizierung von neu identifizierten HF1-verwandten Gensequenzen	41
3.6.6	Oligonukleotide zur Amplifizierung von F13B	41
3.6.7	Oligonukleotide für die Alu-PCR	41
3.6.8	YAC-spezifische Oligonukleotide	41
3.6.9	Weitere verwendete Oligonukleotide	42
3.7	Antikörper	42
3.7.1	Antikörper gegen Faktor H und Faktor H verwandte Proteine	42
3.7.2	Antikörperkonjugate	43
3.8	Verwendete Organismen und Vektoren	43
3.8.1	BAC und pBeloBAC11	43
3.8.2	<i>S. cerevisiae</i> AB1380 und pYAC4	44
3.8.3	Eukaryontische Zellen	45
4	Methoden	46
4.1	Arbeiten mit DNS	46
4.1.1	Isolierung von DNS	46
4.1.1.1	Plasmidisolierung aus Bakterienzellen (Kleinansatz)	46
4.1.1.2	Plasmidisolierung aus Bakterienzellen (Mittelansatz)	47
4.1.1.3	Isolierung von BAC-DNS	47
4.1.1.4	Isolierung von DNS aus Hefezellen	47
4.1.1.5	Herstellung von DNS-Blöckchen für die PFGE	48
4.1.1.6	Isolierung Genomischer DNS aus Zellen und Gewebe	50
4.1.1.7	Isolierung von DNS aus präparativen Agarosegelen	50
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNS, RNS und Oligonukleotiden	51
4.1.2.1	Fotometrische Konzentrationsbestimmung	51
4.1.2.2	Konzentrationsbestimmung über Agarosegele	51
4.1.3	Restriktion von DNS	52
4.1.3.1	Restriktion von Plasmid-DNS	52
4.1.3.2	Restriktion von BAC-DNS	52
4.1.3.3	Restriktion Genomischer DNS	53
4.1.3.4	Restriktion von DNS-Blöckchen für die PFGE	53
4.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und Kapillartransfer	55
4.1.4.1	TBE- und TPE-Agarosegele	55
4.1.4.2	PF-Gele	56
4.1.5	Nichtradioaktive Hybridisierung	57
4.1.5.1	Herstellung von DIG-markierten DNS-Sonden	58
4.1.5.2	Herstellung von DIG-markierten DNS-Sonden für die Kartierung von YAC	58

4.1.5.3	Hybridisierung von Southern- und Northernblots	59
4.1.5.4	Immundetektion	59
4.1.5.5	Entfernen DIG-markierter DNS-Sonden von Southernblots (Stripping)	60
4.1.6	PCR-Amplifikation von DNA	60
4.1.7	PCR-Amplifikation von großen Fragmenten (long range PCR)	61
4.1.8	Subklonieren von PCR-Produkten	61
4.1.9	Sequenzierung	62
4.1.9.1	Reinigung von PCR-Produkten zur direkten Sequenzierung	63
4.1.9.2	Sequenzierung von subklonierten PCR-Produkten mit ABI	63
4.1.9.3	Sequenzierung mit ALFexpress	64
4.2	Isolierung von YAC- und BAC-Klonen aus den Bibliotheken von Research Genetics	64
4.2.1	Auffinden von YAC-Klonen	64
4.2.2	Reinigung von YAC-Klonen	65
4.2.3	PCR-Amplifikation aus Hefezellen	65
4.2.4	Auffinden von BAC-Klonen	65
4.2.5	Identifikation positiver BAC-Klone aus 395-Vertiefungsplatten	66
4.3	Arbeiten mit RNS	67
4.3.1	Isolierung von RNS	67
4.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNS und Kapillartransfer	68
4.3.3	Reverse Transkription von RNA und RT-PCR	69
4.4	Arbeiten mit Proteinen	69
4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
4.4.2	Westernblot	70
4.4.3	Immundetektion von Westernblots	71
4.5	Zellkultur	72
4.5.1	Kultivierung von Gliomazelllinien	72
4.5.2	Stimulierung von Gliomazelllinien mit IFN γ , IL4 UND IL6	73
5	Ergebnisse	74
5.1	Die genomische Organisation der Faktor H-Genfamilie	74
5.1.1	Analyse von Faktor H-YAC-Klonen	74
5.1.1.1	Differenzierung von HF1- und HF2-Gensegmenten über PCR und Pvu II-Verdau	74
5.1.1.2	Sequenziererergebnisse	78
5.1.1.3	Southernblothybridisierungen: Vergleich YAC-DNS mit genom- ischer DNS	79
5.1.2	Test auf Chimärismus	81
5.1.3	Restriktionskarten der YAC	82
5.1.3.1	Auffinden der HF-Gene auf den YAC	88
5.1.4	Analyse der Faktor H-BAC	96
5.1.4.1	PCR-Ergebnisse	96
5.1.4.2	Sequenziererergebnisse	97
5.1.4.3	Restriktionskartierung nach PFGE und Restriktionskarten der BAC	98
5.1.4.4	Hinweis auf ein weiteres Faktor H verwandtes Gen	105

5.2	Expression und Organisation der Gene HF2 und HF3	108
5.2.1	Genomische Organisation von HF2 und HF3	108
5.2.3	Untersuchungen zu Deletionen in der HF-Genfamilie	111
5.3	Untersuchungen zum Polymorphismus des HF2-Gens	112
5.3.1	Grundlagen zum HF2-Polymorphismus	113
5.3.2	Die HF2-Deletion in Rheumapatienten und Kontrollpersonen	114
5.4	Expression der HF-Genfamilie im Gehirn und in Gliomazelllinien	114
5.4.1	Westernblotanalysen zum Nachweis von Faktor H, FHRP1 und FHRP2 in Liquor	115
5.4.2	Northernblotanalysen zum Nachweis der HF-Genfamilie in Hirngeweben und Gliomazelllinien	116
6	Diskussion	121
6.1	Genetik der Faktor H-Genfamilie	121
6.1.2	Probleme bei der genetischen Analyse der Faktor H-Genfamilie	125
6.1.3	Evolution der Faktor H-Genfamilie	125
6.1.4	Homologien und Duplikationen bei den Genen der Faktor H-Genfamilie	127
6.1.5	Duplikationen und Deletionen in der Faktor H-Genfamilie	128
6.2	Expression der Faktor H-Genfamilie im Gehirn und in Hirnzelllinien	130
6.2.1	Expressionsmuster und Funktion der HF-Genfamilie im Gehirn und in Gliomazelllinien	130
6.2.2	Regulation der Expression der HF-Genfamilie in Gliomazelllinien durch INF γ , IL4 und IL6	133
7	Zusammenfassung	136
8	Literaturverzeichnis	138
9	Anhang	146

1 EINLEITUNG

1.1 DAS KOMPLEMENTSYSTEM

»Le sérum de nombreux animaux renferme de l'alexine, c'est-à-dire une matière mal définie, encore inconnue dans sa constitution chimique, à la présence de laquelle on attribue cette propriété qu'ont généralement les sérums, d'exercer une influence destructive sur diverses cellules et sur certains microbes. L'alexine perd son activité lorsqu'on chauffe à 55° le sérum qui la contient.« Diese Beschreibung der antimikrobiellen Wirkung und Hitze-Inaktivierbarkeit des Komplementsystems – hier Alexine genannt – durch Bordet und Gengou (1901) stellt eine der ersten Veröffentlichungen über das Komplementsystem dar. Die Forschung an dem phylogenetisch wohl ältesten Bestandteil unseres Immunsystems hat inzwischen große Fortschritte gemacht: Und so wurde aus der »matière mal définie« Bordets ein gut charakterisiertes, weit verzweigtes System von Proteinen, deren Struktur und Funktion weitgehend aufgeklärt sind. Das Komplementsystem – Teil des angeborenen Immunsystems – ist an der Aufrechterhaltung des »gesunden« Status quo des Körpers und an der sofortigen Abwehr von Pathogenen maßgeblich beteiligt. Es besteht aus einem verzweigten System von Serum- und membranständigen Proteinen, die auf unterschiedliche Weise aktiviert werden können. Für die frühen Schritte der Komplementaktivierung sind kaskadenartig ablaufende proteolytische Spaltungen und damit verbundene Anlagerungsreaktionen, die zur Bildung und Aktivierung von Enzymkomplexen führen, charakteristisch. Die Hauptrolle spielt hier die C3-Konvertase, die eine Schlüsselstelle bei der Amplifizierung der Komplementreaktion darstellt. Die späteren Aktivierungsschritte sind vor allem durch Anlagerungsreaktionen, die Konformationsänderungen an den betreffenden Proteinen bzw. Proteinkomplexen induzieren, gekennzeichnet. Hauptaufgaben des Komplementsystems liegen in der Lyse und Opsonierung von Pathogenen, der Vermittlung von Entzündungsreaktionen, der Beseitigung von Immunkomplexen und der Modulierung der Immunantwort.

Die meisten in den Körper eindringenden Bakterien, Viren und Parasiten lösen aufgrund ihrer andersartigen Oberflächenbeschaffenheit die Aktivierung von Komplement aus. Daraus resultieren letztendlich die Zerstörung der eingedrungenen Fremdorganismen, durch die terminalen porenbildenden Proteine des Membranangriffskomplexes (MAC) oder die Beladung mit aktivierten Komponenten des Komplementsystems wie C3b bzw. durch Abbauprodukte derselben (iC3b).

Derartig opsonierte Strukturen werden von Makrophagen über die Komplementrezeptoren CR1, -3, und -4 erkannt, gebunden und phagozytiert. Ebenso geschieht es mit Antigen-Antikörper-Komplexen. Die den klassischen Komplementweg aktivierenden Immunkomplexe, werden mit C3b beladen, für die Phagozytose markiert und löslich gehalten. Auf diese Weise wird eine Ablagerung der Immunkomplexe vermieden, was z.B. eine Glomerulonephritis auslösen könnte.

Eine weitere wichtige Aufgabe des Komplementsystems ist die Vermittlung von Entzündungsreaktionen, die im Idealfall die möglichst schnelle Beseitigung der Entzündungsursache zur Folge haben. Im Zuge der Komplementaktivierung werden einige beteiligte Proteine (z.B. C3, C5) proteolytisch gespalten, wobei das größere Spaltprodukt (z.B. C3b, C5b) direkt am Aktivierungsweg beteiligt ist, das kleinere (z.B. C3a, C5a) als anaphylaktisch aktives Protein wirkt. Das potenteste dieser Anaphylatoxine ist C5a. Es bewirkt, durch Bindung an C5a-Rezeptoren auf z.B. Mastzellen, Histamin-Freisetzung gefolgt von Kontraktion der glatten Muskulatur, wirkt chemotaktisch auf phagozytierende Zellen (Basophile, Eosinophile und mononukleäre Phagozyten) und erhöht die Adhäsion und Aggregation von Neutrophilen. C5a induziert in Neutrophilen außerdem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und in phagozytierenden Zellen die Freisetzung von lysosomalen Enzymen. Immunzellen werden also an den Entzündungsherd angelockt und erfüllen dort ihre Aufgabe bei der Pathogenbeseitigung.

Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Arten aktiviert werden: durch Zuckerstrukturen auf bakteriellen Membranen (Mannose-Bindungslektin-Weg, MBL), durch stabilisierende Oberflächen (alternativer Weg) und durch Antigen-Antikörper-Komplexe (klassischer Weg). Alle drei Aktivierungsarten münden in die Bildung eines porenbildenden Komplexes, den MAC.

1.1.1 DER MBL-WEG

Komplement wird auf diesem Weg durch Bindung des im Serum vorkommenden Mannose-Bindungslektin (MBL) an bakterielle Zuckerstrukturen aktiviert. Der MBL-Weg ist phylogenetisch gesehen relativ alt. Dafür sprechen die Entdeckung von MBL-Homologen in Invertebraten (Xin et al., 1997) und die antikörperunabhängige Aktivierung.

MBL ist strukturell verwandt mit der C1q-Komponente des klassischen Komplementaktivierungsweges und gehört zur Familie der Calcium-abhängigen Lektine mit Kollagendomänen, die auch als Collectine bezeichnet werden. Es erkennt spezifisch Mannose- und N-Acetylglucosamin-Reste auf Bakterien, Viren und Parasiten und fördert deren Abtötung indirekt durch Opsonierung und direkt durch die Aktivierung des MBL-Weges. Die Kollagendomäne im MBL-Molekül ist essentiell für die Interaktion mit Collectin-Rezeptoren, die sich vor allem auf Phagozyten befinden, und für die Aktivierung von Komplement (Sumiya und Summerfield, 1997). Nach Bindung

von MBL an die Zuckerstrukturen assoziiert es mit den Serinproteasen MASP (MBL-assoziierte Serinprotease)-1 (Matsushita und Fujita, 1992; Sato et al., 1994) und MASP-2 (Thiel et al., 1997), die ihrerseits Ähnlichkeit haben mit den C1q assoziierten Proteasen C1r und C1s. Durch diese Proteasen wird C4 gespalten, dem wir noch im klassischen Komplementweg begegnen werden. Auch im weiteren Verlauf gleicht der MBL-Weg dem klassischen Komplementaktivierungsweg, der in Kap. 1.1.3 beschrieben wird.

1.1.2 DER ALTERNATIVE KOMPLEMENTAKTIVIERUNGSWEG

Der alternative Komplementaktivierungsweg ist ebenso antikörperunabhängig wie der MBL-Weg, was auf seine frühe Entstehung in der Evolution des Immunsystems hinweist. Er besteht aus 6 Serumglykoproteinen: C3 und den Faktoren B,D,H,I und P, verstärkt Phagozytose durch Opsonierung und wirkt cytolytisch auf viele Bakterien, Parasiten und virusinfizierte Zellen. Dies geschieht spezifisch ohne vorherigen Kontakt oder Gedächtnis, allein auf der Fähigkeit des regulatorischen Systems des alternativen Weges basierend, welches zwischen nicht-aktivierenden, körpereigenen und aktivierenden, körperfremden Oberflächen unterscheiden kann (Meri, 1990 und 1.3.1).

Durch die Generierung von C3b im Serum ist der alternative Komplementweg ständig auf geringer Stufe aktiv. C3 besitzt eine reaktive Thiolesterbindung, die durch Umlagerungen im Molekül an die Oberfläche gelangen kann und mit H₂O reagiert. Dieses hydrolytisch aktivierte C3(H₂O) wirkt wie C3b, kann aber im Gegensatz zu ihm nicht mehr an Membranen binden, da seine Thiolestergruppe bereits »verbraucht« ist. Es kann jedoch mit Faktor B (FB) interagieren, der von Faktor D (FD) zu Bb und Ba gespalten wird. Auf diese Weise entsteht eine Serum-C3-Konvertase, die C3 zu C3b umsetzen kann. Wenn C3b an aktivierende Oberflächen von z.B. Bakterien bindet, wird der alternative Komplementaktivierungsweg in Gang gesetzt. Faktor B lagert sich an und wird von der Serumprotease Faktor D gespalten. Das kleine Spaltprodukt Ba diffundiert ab und zurück bleibt der membrangebundene Proteinkomplex C3bBb mit proteolytischer Aktivität: die C3-Konvertase des alternativen Komplementaktivierungsweges. Sie setzt effektiv C3 in C3a, ein Anaphylatoxin, und C3b um (Erdei et al., 1991). Ca. 90% des entstehenden C3b werden schnell inaktiviert indem seine instabile Thioesterbindung mit Wasser reagiert. Nicht inaktiviertes C3b hingegen bindet kovalent an naheliegende Oberflächen, bildet mit Bb zusammen die C3-Konvertase, so daß der Aktivierungsweg verstärkt wird. Ein Großteil der Oberflächen wird mit C3b bedeckt. Dies erleichtert, wie schon erwähnt, die Phagozytose durch Makrophagen, die C3b-Rezeptoren besitzen und leitet die Bildung nachfolgender Komplementkomponenten ein. Sobald sich ein weiteres Molekül C3b an die C3-Konvertase anlagert, entsteht die C5-Konvertase C3bBb3b des alternativen Komplementweges. Das

Serumprotein C5 wird von der Konvertase in C5a und C5b gespalten, wobei C5a als Anaphylatoxin/Entzündungsmediator wirkt. Es verstärkt die Durchblutung lokaler Gefäße und erhöht deren Durchlässigkeit (Frank und Fries, 1991). C5b bleibt an der C5-Konvertase gebunden. Es lagern sich nun eine Reihe von Proteinen an, was schließlich zur Bildung des lytischen MAC führt (Kap. 1.1.4).

1.1.3 DER KLASSISCHE KOMPLEMENTAKTIVIERUNGSWEG

Der klassische Komplementweg wird durch Antikörperkomplexe und Aggregationen von Antikörpern, wie sie auf multideterminanten Antigenen (z.B. bakteriellen Oberflächen) vorliegen, aktiviert. Dazu muß das Serumprotein C1 – ein Heterodecamer aus 6 C1q-, 2 C1s- und 2 C1r-Untereinheiten – gleichzeitig an mehrere Fc-Teile der komplementaktivierenden Antikörperklassen IgM und die IgG-Subklassen 1, 2 und 3 binden. Der C1-Komplex wird seinem Aussehen nach oft mit einem Tulpenstrauß bestehend aus 6 C1q Untereinheiten verglichen: 6 längliche kollagenähnliche Teile tragen die 6 C1q-Köpfe, die mit den Fc-Teilen der Antikörper interagieren. Die Moleküle C1s und C1r sind an den kollagenähnlichen Bereich des C1q-Hexamers angelagert und werden dort nach Kontakt mit Antigen-Antikörperkomplexen aktiviert. Wenn zwei C1q-Untereinheiten gleichzeitig in Kontakt mit Antigen-Antikörperkomplexen gelangen, wird C1r enzymatisch aktiviert, spaltet sich selbst und wirkt als Serinesterase. Diese wirkt auf C1s, wobei zwei Spaltfragmente entstehen, von denen das kleinere ebenfalls Serinesteraseaktivität besitzt und auf die Serumproteine C4 und C2 wirkt. C4 wird in C4a, ein Anaphylatoxin mit vergleichbarer Wirkung zu C5a und C3a (Frank und Fries, 1991), und C4b, welches kovalent an die Aktivierungsstelle, d.h. den Antikörperkomplex bzw. die mit Antikörpern bedeckte Pathogenmembran, bindet, gespalten. Membrangebundenes C4b tritt mit C2 zusammen und auch dieses wird von der C1s-Serinesterase zu zwei Produkten prozessiert. C2b verläßt den Komplex, der nun aus C4b2a besteht und die C3-Konvertase des klassischen Komplementweges darstellt. Analog zum alternativen Weg wird C3 in C3a und C3b gespalten. Nicht hydrolytisch inaktiviertes C3b opsoniert die umgebenden Oberflächen und bereitet diese für die Phagozytose durch Makrophagen vor. Kommt C3b nahe bei der C3-Konvertase zu liegen, dann lagern sich die Moleküle zusammen: es entsteht mit C4b2a3b die C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges, die C5 spaltet und die Bildung der terminalen MAC-Komplexe einleitet.

1.1.4 DER MEMBRANANGRIFFSKOMPLEX (MAC)

Die Aktivierung des MBL-, des alternativen und klassischen Komplementweges mündet in die Bildung des MAC. Ausgangspunkt für seine Bildung ist die C5-Konvertase, an der C5b gebunden

bleibt und als Anheftungspunkt für C6 dient. Dieser Proteinkomplex stellt nun eine Bindungsstelle für C7 dar. C7 erfährt eine bindungsinduzierte Konformationsänderung durch die eine hydrophobe Domäne freigelegt wird, die in die bakterielle Membran inserieren kann. Nun tritt C8 hinzu: es verändert wie C7 seine Konformation, lagert sich in die Bakterienoberfläche ein und ermöglicht nun die Ausbildung einer Pore durch 10-18 C9 Moleküle. Die Bildung des MAC ist damit abgeschlossen (Müller-Eberhard, 1986). Durch die Poren verliert die Bakterienzelle ihr homöostatisches Gleichgewicht und den Protonengradienten über ihrer Membran. Außerdem können Enzyme wie Lysozym eindringen, die das Bakterium schädigen. All dies führt letztendlich zur Vernichtung der eingedrungenen Bakterien.

Der MAC des Komplementsystems ist homolog zu den durch cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen induzierten Perforinporen (Liu, 1995). Die Homologie besteht jedoch nicht nur auf der Funktionsebene. Sie erstreckt sich auch auf immunologische Kreuzreaktivität und Aminosäuresequenzidentität zwischen Perforin und den terminalen Komplementkomponenten C6-C9. Die AS-Sequenzidentität beträgt 20% und besteht zwischen der zentralen, in die Zellmembran inserierenden Domäne von Perforin und den betreffenden Regionen von C6-C9 (Liu, 1995). Es scheint hier also eine optimale Struktur entstanden zu sein, die sowohl vom unspezifischen also auch vom spezifischen Immunsystem genutzt wird. In der folgenden Abbildung sind alle drei Wege der Komplementaktivierung und die Bildung des MAC dargestellt.

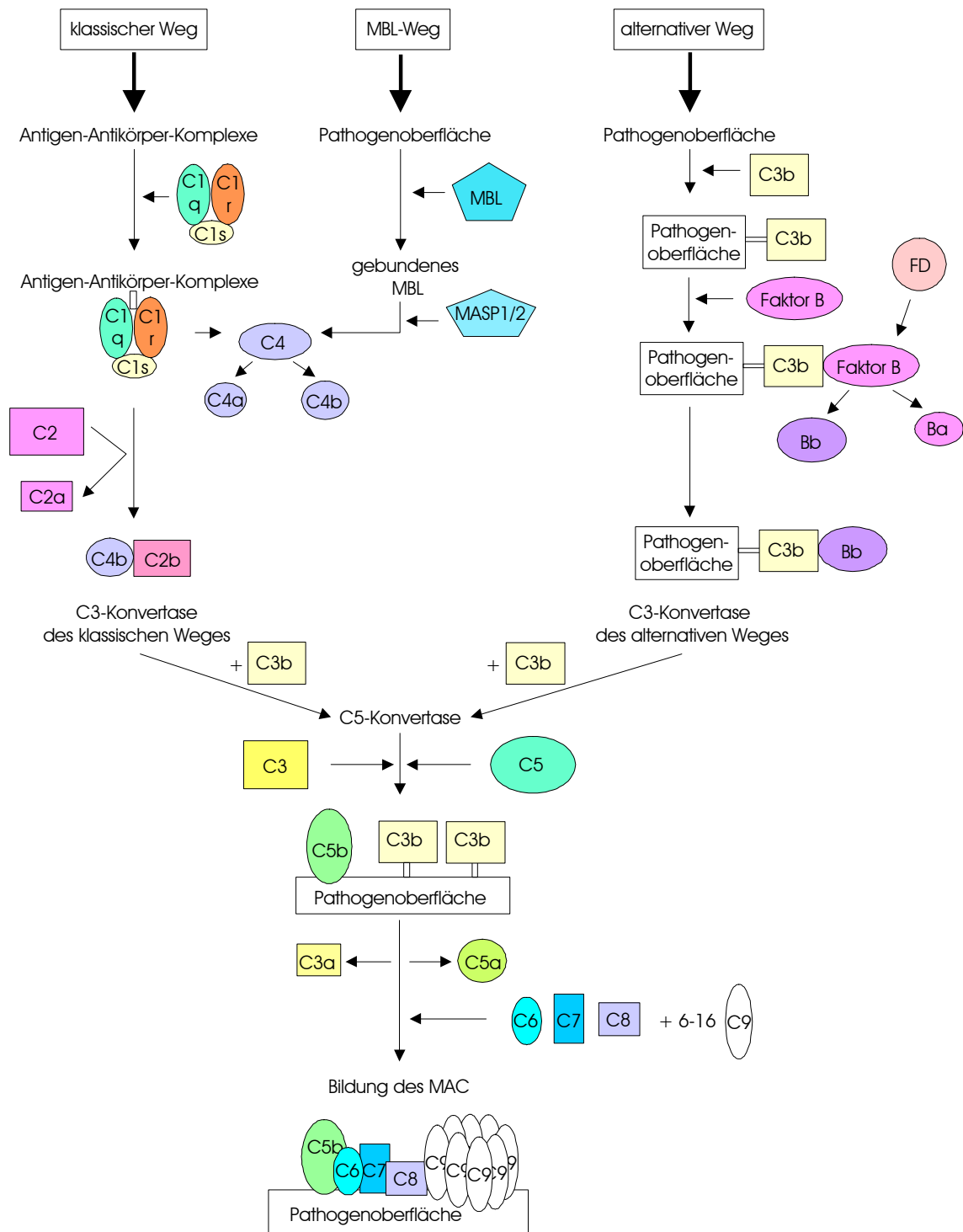


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Wege der Komplementaktivierung und die Bildung des Membranangriffskomplexes.

1.2 REGULATION DER KOMPLEMENTAKTIVIERUNG

Ein so komplexes und effektives System wie das der Komplementaktivierungswege verlangt nach ebenso effektiver Kontrolle. Dies wird zum einen dadurch erreicht, daß die Halbwertszeiten der aktiven Komponenten recht kurz sind, zum anderen sorgt eine Anzahl von Regulationsmolekülen im Serum und auf Membranen dafür, daß Komplement nicht auf körpereigenen Oberflächen aktiviert wird, die Komplementreaktion so gut wie möglich auf die Zielstrukturen beschränkt bleibt und die Aktivierung nicht zum übermäßigen Verbrauch bestimmter Komplementproteine führt.

1.2.1 REGULATION DES KLASSISCHEN KOMPLEMENTWEGES UND DES MBL-WEGES

Die Aktivierung der C3-Konvertase des klassischen Komplementweges und des MBL-Weges wird hauptsächlich von den Serumproteinen C1-Inhibitor (C1-INH), C4-bindendes Protein (C4BP) und Faktor I (FI), sowie von den membranständigen Molekülen Decay Accelerating Factor (DAF), Membran Cofaktor (MCP) und Komplementrezeptor 1 (CR1) reguliert.

C1-INH gehört zur Serpin (Serinproteaseinhibitor)-Familie der Proteinprotease-Inhibitoren, zu denen auch α -Antitrypsin zählt. C1-INH hemmt irreversibel die Serinproteasen C1s und C1r des C1-Komplexes und sorgt so für eine begrenzte Aktivierung der C2 und C4 Komplementkomponenten. Mangel an C1-INH, eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, führt zum hereditären Angioödem. Ein dem C1-INH entsprechendes Molekül für den MBL-MASP-1/-2-Komplex ist bisher noch nicht identifiziert worden. Die im Folgenden beschriebenen Regulationsmechanismen treffen sowohl für den MBL- als auch den klassischen Komplementweg zu.

Die C3-Konvertase des klassischen Komplementweges ist ein Hauptangriffspunkt der Regulation. Sie hat von vorneherein eine geringe Halbwertszeit von ca. 5 min, und zudem wird ihre Bildung und Stabilität von mehreren Molekülen beeinflusst. C4BP bindet C4b in Konkurrenz mit C2, schränkt also die Bildung des C4bC2-Komplexes ein, und kann außerdem C2a aus den Konvertase-Komplexen verdrängen, d.h. den Abbau der C3-Konvertase und auch der C5-Konvertase fördern. Eben dies bewirken auch die membranständigen Faktoren DAF und CR1. An C4BP gebundenes C4b wird weiterprozessiert. Es dient als Substrat für Faktor I, der es zu C4c und C4d spaltet. C4BP dient also hier als Kofaktor für die FI vermittelte Spaltung von C4b. Auf Membranen kann die Kofaktor-Funktion für FI von den Proteinen MCP und CR1 übernommen werden. In seinen Funktionen ähnelt C4BP dem Regulator Faktor H des alternativen Komplementweges, der im Folgenden besprochen wird.

1.2.2 REGULATION DES ALTERNATIVEN KOMPLEMENTWEGES

Die Regulation des alternativen Komplementweges übernehmen die für ihn charakteristischen Serumproteine Faktor H (FH) und Properdin. Die bereits vom klassischen Weg bekannten Moleküle Faktor I (FI), DAF und CR1 wirken ebenso regulierend.

FH wirkt sowohl auf die Initiation als auch auf die Aktivierung des alternativen Komplementweges. Er inaktiviert die spontan im Serum entstehende C3-Konvertase $C3(H_2O)Bb$, die membran-gebundenen C3- und die C5-Konvertasen, wenn sie sich auf nicht-aktivierenden Oberflächen befinden, durch Verdrängung von $C3(H_2O)$ bzw. C3b aus den Komplexen. Die membran-gebundenen Proteine DAF und CR1 besitzen ebenso die Fähigkeit C3b aus den Konvertasen zu verdrängen. Ihre Wirkung ist jedoch auf Zelloberflächen beschränkt. Zusammen mit FI bewirkt Faktor H außerdem die Degradation von C3b zu $iC3b$. Auf Membranen kann diese Rolle auch von MCP und CR1 übernommen werden. Die Wirkung von FH wird in Kap. 1.3.1.1 genauer besprochen. Im Gegensatz zum klassischen Komplementaktivierungsweg gibt es im alternativen Weg einen Faktor, der die Konvertasen stabilisiert: Properdin. Properdin lagert sich an die C3- und die C5-Konvertase an und stabilisiert und schützt sie gegen Abbau durch FH, DAF und CR1.

1.2.3 REGULATION DES MAC

Ungewollte Aktivierung und Bildung des MAC werden im Körper durch die membranständigen CD59 (Protectin/HFR-20/MACIF/MIRL) und HFR (C8BP/MIP) und durch die Serumproteine Vitronectin (S-Protein) und Clusterin (SP40-40) auf unterschiedlichen Ebenen verhindert. Die beiden Serumproteine verhindern, daß MAC, die sich von der Aktivierungsstelle ablösen (soluble MAC, sMAC), aktiv bleiben, sich an Membranen unbeteiligter Zellen anheften und diese beeinträchtigen. Dabei bindet Vitronectin nahe an die Membrananheftungsstelle des $sC5b-7$ Komplexes, so daß diese nicht mehr zur Verfügung steht (Podack et al., 1984). Auf ähnliche Weise wirkt Clusterin, jedoch interagiert dieses Protein mit dem vollständigen MAC $sC5b-9$ (Jenne et al., 1989 und Choi et al., 1990).

Kommen wir nun zu den membranständigen Regulatoren des MAC, CD59 und HFR: CD59 ist der Hauptinhibitor des MAC auf Zelloberflächen. Das Molekül verhindert die durch C5b-8-katalysierte Insertion in die Membran und die nachfolgende Polymerisation und Porenbildung durch Anlagerung von C9 Molekülen (Meri et al., 1990 und Rollins und Sim, 1990).

HFR wirkt ebenso wie CD59 auf die Insertion und Polymerisation des MAC-Komplexes in die Zellmembran (Zalman et al., 1986 und Watts et al., 1990). Beide Membranproteine sind über einen GPI-Anker in die Membran inseriert und werden auch als lösliche Proteine im Serum

und anderen Körperflüssigkeiten gefunden, wo sie ebenfalls komplementregulatorisch wirken (Rooney et al., 1992).

1.3 FAKTOR H UND DIE FAKTOR H-FAMILIE

Die Funktion des Serumprotein Faktor H (FH), wurde erstmals 1976 von Whaley und Ruddy beschrieben: die Regulation des alternativen Komplementweges auf der Ebene der C3- und auch C5-Konvertase.

Das Faktor H kodierende Gen HF1, ca. 100 kb groß, ist auf Chromosom 1q32 lokalisiert und befindet sich auf einem 650 kb großen DNS-Fragment zusammen mit F13B und dem HF1-verwandten Gen HF3 (Rey-Campos et al., 1990; Skerka et al., 1995). Den ersten Hinweis auf die mögliche Existenz mehrerer HF1-verwandter Gene, gaben Southernblothybridisierungen von HF1-spezifischen Sonden auf genomische DNS. Man erhielt bei weitem mehr hybridisierende Banden als man vom HF1-Gen erwartet hatte (Estaller, 1994). Das erste HF1-verwandte Gen, HF2 (Genprodukt: factor H related protein 1; FHRP1) wurde dann 1991 von Estaller et al. beschrieben. Weitere HF1-Verwandte kamen hinzu: die cDNS kodierend für FHRP2 (Skerka et al., 1991), FHRP3 (Skerka et al., 1993) und FHRP4 (Skerka et al., 1997). Zunächst werden jedoch Funktion und Struktur von FH, anschließend die der FHRP beschrieben. Ein Hinweis zur Nomenklatur: die Gene, die für FH und die FHRP kodieren werden HF1, für Faktor H, HF2 für FHRP1, HF3 für FHRP2, HF4 für FHRP3 und HF5 für FHRP4 genannt.

1.3.1 FAKTOR H

Im Folgenden werden Funktion und Struktur des komplementregulatorischen Proteins Faktor H und die Struktur, Regulation und Expression seines Gens beschrieben.

1.3.1.1 FUNKTION VON FAKTOR H

Die Funktion von FH in der Regulation des alternativen Komplementaktivierungsweges kann mit zwei Schlagworten beschrieben werden: Kofaktor- und Dissoziationsaktivität. Zum ersten Punkt, der Kofaktoraktivität: Im Zuge der kontinuierlichen Bildung von C3b durch die Serum-C3-Konvertase C3(H₂O)Bb und der verstärkten Bildung durch die Membran-C3-Konvertase C3bBb entsteht eine große Menge C3b, welches die Fähigkeit besitzt, sich kovalent an Membranen anzulagern. Dabei unterscheidet C3b nicht zwischen körpereigenen und Pathogen-Oberflächen. Ob C3b nun auf diesen Oberflächen inaktiviert wird oder Ausgangspunkt für die Inangsetzung des alternativen Komplementweges ist, entscheidet seine Affinität zu FH. Diese ist abhängig

von der Zusammensetzung der Membranoberfläche: können C3b und FH mit oberflächen-gebundenen polyanionischen Zuckerstrukturen, wie Heparin oder Sialinsäure interagieren, erhöht sich die Affinität zwischen ihnen. Interaktion mit z.B. Polysacchariden führt zu einer Verminderung der Affinität zwischen FH und C3b (Meri und Pangburn, 1990 und 1994; Koistinen, 1992). Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen körpereigenen, nicht-aktivierenden Oberflächen, charakterisiert durch das Vorhandensein von Polyanionen und pathogenen, aktivierenden Membranen, mit z.B. bakteriellen Polysacchariden, gewährleistet. Auf nicht-aktivierenden Oberflächen bindet FH mit hoher Affinität an C3b und induziert am Molekül eine Konformationsänderung. Nun kann Faktor I, eine Serin-Protease, hinzutreten: FI bindet an C3b und FH und erfährt ebenfalls eine Änderung der Konformation, was möglicherweise die nachfolgende Spaltung von C3b erleichtert (DiScipio, 1992). C3b wird also in Kooperation von FI und FH gespalten und zu iC3b inaktiviert (Soames und Sim, 1997). iC3b ist wie C3b ein Opsonin, es vermittelt Phagozytose durch Makrophagen über den Komplementrezeptor 3 (CR3) und vermutlich auch CR4.

Das zweite Schlagwort zur Beschreibung der Aktivität von FH ist seine Dissoziationsaktivität. Diese Wirkung wird benötigt, wenn die Bildung der C3-Konvertase auf nicht-aktivierenden Oberflächen bereits eingetreten ist. Auch in diesem Fall ist die Affinität von FH zu C3b im C3-Konvertasekomplex C3bBb entscheidend. Sie ist auf nicht-aktivierenden Membranen höher als die Affinität von C3b zu Bb, so daß FH Bb aus dem Komplex verdrängen kann und so die C3-Konvertase inaktiviert (Whaley und Ruddy, 1976; Pangburn et al., 1977). Faktor H verhindert also, durch die Fähigkeit nicht-aktivierende von aktivierenden Oberflächen unterscheiden zu können, die Aktivierung des alternativen Komplementweges auf körpereigenem Gewebe.

Abgesehen von der Aufgabe im alternativen Komplementweg wurden für FH noch weitere mögliche Funktionen beschrieben. Ohtosuka et al. (1993) entdeckten bei Thrombin-verdautem FH chemotaktische Aktivität für Monozyten. Sie spekulieren über eine Rolle von FH bei der »delayed type hypersensitivity« (DTH)-Reaktion. Chemotaktische Aktivität finden Nabil et al. (1997) für FH: FH soll Monozyten anlocken und dadurch die Phagozytose von malignen Zellen über den iC3b-CR3 Weg verstärken.

Eine Fähigkeit zur Vermittlung von Zelladhäsion wurde beim verkürzten Faktor H-Protein p43 gefunden (Hellwage et al., 1997), jedoch nicht bei FH, obwohl auch FH das adhäsionsvermittelnde RGD (Arg-Gly-Asp)-Motiv trägt (Hynes, R.O., 1987).

Auf polymorphnukleären Leukozyten wurde ein FH-Rezeptor (FHR) postuliert (Avery und Gordon, 1993): die Bindung von FH an der Zelloberfläche soll zu einer verstärkten Erkennung opsonierter Zellen führen, Signale in die Zelle übermitteln bzw. die Zellen vor einer Komplementattacke schützen.

Ein Effekt, der auf die Kofaktoraktivität von FH mit FI zurückgeht, ist die von Vetvicka et al. (1993) beschriebene Generierung eines Wachstumsfaktors aus C3i, iC3i genannt. Raji-Zellen synthetisieren mit endogen gebildetem FH und FI den Wachstumsfaktor iC3i, der über CR2 an die Zellen bindet und sie in Medium ohne fötales Kälberserum wachsen läßt.

Relativ selten wird genetisch bedingter Mangel an FH beobachtet (Ault et al., 1997). Symptome sind vor allem Mangel an C3 durch unregulierten Verbrauch und damit einhergehende Glomerulonephritis. (Morgan, 1990). Kürzlich wurde FH-Mangel bzw. Mutationen im HF1-Gen mit dem hämolytischen urämischen Syndrom (HUS) in Verbindung gebracht (Warwicker et al., 1998, Rougier et al., 1998, Ohali et al., 1998).

FH scheint, wenn man alle seine bekannten und postulierten Funktionsweisen zusammen betrachtet, ein »vielseitiges« Protein zu sein. Dies steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu seinem gleichförmigen Aufbau aus 20 SCR-Domänen.

1.3.1.2 STRUKTUR VON FAKTOR H

FH ist ein 1213 Aminosäuren (AS) großes Serumglykoprotein, das aus SCR (short consensus repeats) Domänen mit jeweils ca. 60 AS aufgebaut ist (Ripoche et al., 1988). SCR-Domänen sind globuläre Module, bestehend aus einem hydrophoben β -Faltblattkern aus dem Schleifen heraustreten, die für die Interaktion mit Liganden zuständig sind. Die Struktur wird durch 4 konservierte Cysteinreste, die 2 Cystinbrücken bilden (Verknüpfungsmodus 1-3 und 2-4), und verschiedene andere charakteristische AS bestimmt (Kristensen et al., 1987). SCR-Domänen sind in vielen komplementregulatorischen Molekülen wie z.B. DAF, MCP, C4BP und CR1 enthalten, kommen aber auch in anderen Proteinen, z.B. in Faktor 13B, in der α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors und in Adhäsionsmolekülen wie ELAM-1 und MEL-14 vor. FH und die FH-verwandten Proteine bestehen jedoch, im Gegensatz zu den anderen genannten, ausschließlich aus SCR-Domänen.

Einigen SCR-Domänen von FH wurden bereits Funktionen zugewiesen: die N-terminalen SCR 1-5 sind für die Interaktion mit C3b und Faktor I zuständig, auf ihnen liegt die Kofaktoraktivität von FH (im vorhergehenden Kapitel beschrieben) (Gordon et al., 1995). Ebenso wurden in den SCR6-10 und 16-20 C3b-Bindungsstellen identifiziert (Sharma und Pangburn, 1996). SCR13 vermittelt die Interaktion mit Heparin, eine weitere Interaktionsstelle wurde in SCR7 identifiziert (Pangburn et al., 1991; Blackmore et al., 1996). Auch im C-terminalen Bereich des Moleküls, in dem bisher nur eine Bindungsstelle für C3b bekannt war, entdeckten kürzlich Ram et al. (1998) die FH-Bindungsstelle für Sialinsäure. Die Heparin- und Sialinsäurebindungsstellen bedingen zusammen die Fähigkeit des FH zwischen aktivierenden und nicht-aktivierenden Membranen zu unterscheiden. So tarnen sich *Neisseria gonorrhoeae*, indem sie ihr Lipooligosaccharid (LOS)

mit Sialinsäure aus dem Wirtsserum modifizieren: FH interagiert mit der gebundenen Sialinsäure und verhindert durch seine Kofaktoraktivität mit FI und seine Dissoziationsaktivität, die Bildung der C3-Konvertase und die Aktivierung des alternativen Komplementweges auf diesen Bakterien (Ram et al., 1998).

FH ist ein N-glykosyliertes Molekül mit Glykosylierungsstellen an den SCR4, 9, 14, 15 (2 Stellen), 17 und 18. Neben diesen Modifikationsvarianten gibt es von FH noch 5 verschiedene allelische Varianten, die sich in der IEF-Analyse unterscheiden und Genfrequenzen von 0,685, 0,301, 0,006, 0,002 und 0,006 in der mitteleuropäischen Bevölkerung haben (Rodriguez de Cordoba et al., 1987). Über diese Varianten hinaus existiert ein 1,8 kb großes alternatives Spleiß-/Polyadenylierungsprodukt der 4,3 kb großen HF1-mRNS. Es kodiert für eine verkürzte Form von FH, FH_{p43} genannt, die die SCR-Domänen 1-7 und vier charakteristische carboxyterminale AS umfaßt (Estaller et al., 1991). Diese Form ist wie FH ein Serumprotein, hat ein Molekulargewicht von 43 kDa und ist unglykosyliert. FH_{p43} verfügt über die FI- und C3b-Bindungsdomäne und ist in geringem Umfang regulatorisch als Kofaktor bei der FI vermittelten Spaltung der C3-Konvertase aktiv (Misasi et al., 1989). Mit Abbildung 2, in der die funktionellen Domänen von FH dargestellt sind, beenden wir dieses Kapitel und wenden uns der Expression und der Regulation des HF1-Gens zu.

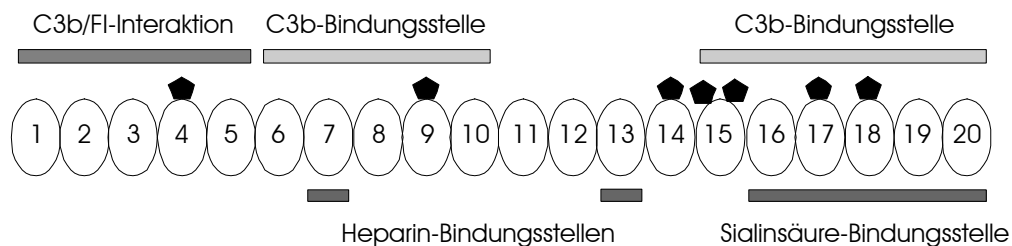


Abbildung 2: Funktionelle Domänen des FH-Moleküls.

Die SCR-Domänen von FH sind durch Ovale symbolisiert, Glykosylierungsstellen durch schwarze Fünfecke an den jeweiligen SCR-Domänen. C3b/FI-, C3b- und Sialinsäureinteraktionsstellen im Molekül sind durch hell- und dunkelgraue Balken markiert.

1.3.1.3 STRUKTUR, EXPRESSION UND REGULATION DES FAKTOR H-GENS (HF1)

HF1 liegt, wie schon erwähnt auf Chromosom 1q32 (Kap. 1.3), überspannt eine Länge von ca. 100 kb, besitzt einen Promotor ohne TATA- und CCAAT-Box und ist wie die meisten Komplementproteine durch IFN γ stimulierbar (Williams und Vik, 1997). Ein IFN γ -bindendes Motiv (IRE), das die Stimulierbarkeit mit dem Cytokin erklären könnte, wurde bisher noch nicht identifiziert (Williams und Vik, 1997; Ward et al., 1997). HF1 umfaßt 22 Exons: Exon 1 und

2 kodieren für den 5'UT-Bereich und das Signalpeptid, Exon 22 für den 3'UT-Bereich und SCR20, die restlichen Exons kodieren jeweils für einzelne SCR-Domänen. Von HF1 werden zwei Genprodukte abgelesen: FH_{gp150} bestehend aus 20 SCR-Domänen und das alternative Spleißprodukt FH_{p43} bestehend aus den ersten 7 SCR-Domänen sowie 4 charakteristischen Aminosäuren.

Hauptsyntheseort des Serumproteins FH ist die Leber, daneben wird FH noch von einer Reihe anderer Zellen produziert: Endothelzellen, peripheren Blutmonozyten, der Monozytenzelllinie U937, Glomerulomesangialzellen, Gliomazelllinien, Fibroblasten und Lungengewebe (Schwaeble et al., 1987; Ripoche et al., 1988; Whaley, 1980; Malhotra und Sim, 1985) Van den Dobbelen et al., 1994; Gasque et al., 1992; Schwaeble et al., 1991). Die extrahepatische Synthese von FH könnte eine Rolle bei der sofortigen Kontrolle des alternativen Komplementweges nach Aktivierung im betroffenen Gewebe spielen. Von Bettina Dierl (1997) wurden HF1-spezifische Transkripte mittels RT-PCR in verschiedenen Geweben und Zellen gefunden, so in Colon, Gehirn, Kleinhirn, Lymphknoten, Niere, Plazenta, HeLa, peripheren Blutlymphozyten (PBL) und Zellen einer T-Zell-Leukämie (TLL). Nach IFN γ -Stimulation waren auch in MM6 und U937 Zellen HF1-Transkripte nachweisbar (vgl. auch Malhotra und Sim, 1985).

FH_{gp150} kommt im Serum in einer Konzentration von 200-600 mg/l vor, das verkürzte FH_{p43} in 10-50 mal geringerer Konzentration. Wie schon erwähnt ist die Transkription des HF1-Gens durch IFN γ stimulierbar. Die anderen proinflammatorischen Cytokine wie Interleukin 1 (IL1), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 6 (IL6) haben keinen Einfluß auf die Expression des HF1-Gens. TNF α verstärkt jedoch die stimulierende Wirkung von IFN γ (Williams und Vik, 1997). Für HF1 ist, wie auch für einige andere untersuchte Komplementgene, IFN γ der Haupt-Akute-Phase-Induktor (Volonakis, 1995).

1.3.2 DIE FAKTOR H-FAMILIE

Mit dem aus 5 SCR-Domänen bestehenden FHRP1 (factor H related protein 1) wurde 1991 von unserer Arbeitsgruppe die cDNS des ersten Faktor H verwandten Proteins entdeckt, dem bis jetzt 3 weitere folgten (Estaller et al. 1991; Skerka et al., 1991, 1993, 1997; Zipfel und Skerka, 1994). Im Gegensatz zu Faktor H ist von der Funktion der FHRP wenig Definitives bekannt. In den folgenden Abschnitten werden Struktur und mögliche Funktionen der FHRP sowie die Regulation und Expression der Gene HF2- 5 besprochen. In Abbildung 3 sind HF1 und die verwandten Transkripte schematisch dargestellt.

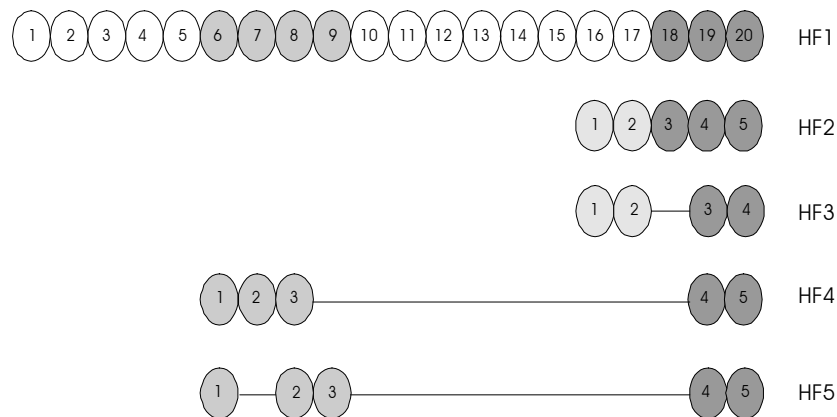


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteinkodierenden Exonsequenzen von HF1 und den HF1-verwandten Genen.

Die Exons, die für SCR-Domänen kodieren, sind als Ovale dargestellt. Die Zahlen in den Ovalen beziehen sich auf die jeweilige kodierte SCR-Domäne des betreffenden Proteins. SCR-Domänen mit Sequenzähnlichkeit liegen untereinander und tragen gleiche Grauschattierungen.

1.3.2.1 STRUKTUR DER FHRP

Wie Faktor H bestehen alle FHRP ausschließlich aus SCR-Domänen unterschiedlicher Anzahl: FHRP1 hat 5, FHRP2 besitzt 4 und FHRP 3 und 4 sind aus jeweils 5 SCR-Domänen aufgebaut. Einige FHRP sind glykosyliert. Von FHRP1 und -2 kommen unterschiedlich glykosylierte Formen im Serum vor, wobei FHRP1 hochglykosyliert als 43 kDa-Bande und geringer glykosyliert als 39 kDa-Bande und FHRP2 glykosyliert als 29 kDa-Bande bzw. unglykosyliert als 24 kDa-Bande im Westernblot erscheinen.

Vergleicht man FH und die FHRP in Bezug auf Aminosäure- und Nukleinsäureidentität, so fällt auf, daß vor allem in den 2 bzw. 3 C-terminalen SCR viele Positionen identisch sind. Die FHRP 4 und 5 besitzen auch in ihren restlichen SCR-Domänen relativ hohe Ähnlichkeit zu SCR aus FH, wogegen die zwei ersten SCR von FHRP1 und 2 untereinander sehr ähnlich sind, aber nur in geringem Ausmaß zu den SCR6 und 7 von FH. In der folgenden Tabelle sind Nukleinsäure- und Aminosäureunterschiede (in Klammern) der relevanten SCR-Domänen angegeben. Beide Angaben sind in Prozent aufgeführt.

Die starke Konservierung bestimmter SCR-Domänen weist auf eine mögliche funktionelle Bedeutung hin. Besonders stark ist die Sequenzidentität innerhalb der zwei C-terminalen SCR-Domänen von FH und den FHRP1- 4. Auf mögliche funktionelle Relevanz der Sequenzähnlichkeiten wird im folgenden Kapitel eingegangen.

Tabelle: Vergleich von HF1/FH und den HF2- 5/FHRP1- 4 in Bezug auf Nukleinsäure- und Aminosäureunterschiede (Angaben in Prozent).

HF1/FH	SCR6 65 AS	SCR7 58 AS	SCR8 63 AS	SCR9 53 AS	SCR18 59 AS	SCR19 62 AS	SCR20 67AS
HF2/FHRP1	39,5 (58,5)	42,9 (66)	-	-	0,6-2,8 (0-5)	0,6 (0)	1-2 (2,9)
HF3/FHRP2	40 (58)	42,4 (66)	-	-	-	7,2 (14,5)	20,8 (32,8)
HF4/FHRP3	4,1 (7,7)	4,6 (10,3)	24,8 (33)	-	-	27,6 (38,7)	41,3 (60)
HF5/FHRP4	13,3 (27,7)	-	24,7 (33)	18,6 (32)	-	26,3 (35,5)	42,5 (60)

In der obersten Reihe sind die SCR-Domänen von FH aufgeführt, die als Ausgangspunkt für Vergleiche der Nukleinsäure- und Aminosäureunterschiede (in Klammern) mit den homologen Domänen der HF2- 5/FHRP1- 4 dienen. Zur Erläuterung z.B. Spalte 3 SCR8 von HF1/FH: keine SCR8 ähnliche Domäne ist in HF2/FHRP1 und HF3/FHRP2 zu finden. Dagegen findet man eine SCR8 ähnliche Domäne sowohl in HF4/FHRP3 als auch in HF5/FHRP4. Die Nukleinsäure-Unterschiede betragen im Vergleich zur SCR8-Sequenz von HF1 24,8% für HF4 SCR3 bzw. 24,7% für HF5 SCR2. Die Aminosäureunterschiede betragen analog 33% für SCR3 von FHRP3 bzw. SCR2 FHRP4 im Vergleich zum SCR8 von FH. Die Angaben bei den SCR19 und 20 homologen SCR von HF2 variieren je nach HF2-Allel (HF2a, b, c).

1.3.2.2 MÖGLICHE FUNKTIONEN DER FHRP

Den in allen FHRP vorkommenden zu FH sequenzähnlichen Domänen (SCR18-20 von FH), wurde kürzlich, wie bereits erwähnt (Kap. 1.3.1.2), eine Funktion im FH-Protein bei der Sialinsäurebindung zugewiesen (Ram et al., 1998). Ebenso findet man bei FH in diesen C-terminalen SCR eine C3b-Bindungsstelle (Sharma und Pangburn, 1996). Auch die zweite Region der SCR6 und 8 von FH weist, wenn auch geringer als die eben genannte Region, Sequenzidentität mit entsprechenden SCR der verschiedenen FHRP auf. Im FH-Molekül wurde dieser Domäne ebenfalls Interaktion mit C3b und Heparin zugewiesen (Sharma und Pangburn; Blackmore et al., beide 1996, Abbildung in Kap. 1.3.1.2). Ob diese oder eine ähnliche Funktion in den FHRP erhalten ist, wurde bisher experimentell nicht nachgewiesen.

Anhaltspunkte für mögliche Funktionen der Proteine FHRP1 und -2 sowie FHRP4 ergaben sich aus den Ergebnissen von Park und Wright (1996) bzw. Skerka et al. (1997). Erstere entdeckten FHRP1 und -2 in einem Plasmapartikel bestehend aus den FHRP, Apolipoprotein A-I und Phospholipid. Dieser Protein-Lipidpartikel kommt assoziiert mit Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) vor, welches eine Rolle bei der Integrin- und CD14-vermittelten Zelladhäsion von Neutrophilen nach Kontakt mit Lipopolysaccharid (LPS) spielt. Der Protein-Lipidpartikel verstärkt die Adhäsion der Neutrophilen bei in vitro Versuchen. Ebenfalls als Bestandteil eines Protein-Lipidpartikels, in diesem Fall triglyceridreicher Lipoproteine, wurde FHRP4 identifiziert (Skerka

et al., 1997). In diesen Partikeln liegt das FH-verwandte Protein in glykosylierter Form als Homodimer vor (Hellwage et al., 1997).

In beiden Fällen ist jedoch die Funktion der FHRP in den Lipoproteinpartikeln nicht geklärt. Es ist offen, ob sie dem Strukturerehalt dienen oder eine Funktion bei der Interaktion dieser Partikel mit anderen Molekülen haben. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit und der stellenweise hohen Sequenzidentität zu FH, scheinen die FHRP von der Komplementregulation unabhängige Aufgaben zu haben.

1.3.2.3 REGULATION UND EXPRESSION DER GENE HF2- 5

Über die Regulation und Expression der für die FHRP kodierenden Gene HF2- 5 ist nur wenig bekannt. Expressionsuntersuchungen (RT-PCR) wurden von Bettina Dierl (1997) an verschiedenen Geweben und Zelllinien durchgeführt. Dabei entdeckte sie die Expression von HF1 in Gehirngewebe. In meiner Arbeit beschränkte ich mich auf die Untersuchung verschiedener Gehirnareale und Gliomazelllinien.

Transkripte der Gene HF2- 5 können in Leber cDNA gefunden werden. Es ist also anzunehmen, daß wie für FH auch für die FHRP die Leber der Hauptsyntheseort dieser Serumproteine ist. Die Serumkonzentrationen sind nur für FHRP1 und 2 bekannt: sie liegen bei ca. 40 µg/ml für FHRP1 und betragen für FHRP2 ca. die Hälfte (Timmann et al., 1991; eigene Beobachtungen im Westernblot).

Nun zur Regulation der Gene HF2- 5: untersucht wurde ausschließlich die Stimulierbarkeit mit IFN γ in den monozytären Zelllinien U937 und MM6 (Dierl, 1997). Die Expression der Gene wurde mittels RT-PCR analysiert. HF2 ist im Gegensatz zu FH nicht mit IFN γ stimulierbar, dagegen reagieren die Gene HF3 und 4 mit gesteigerter Expression auf dieses Cytokin. Für HF5 liegen keine Daten vor.

1.4 DIE GENETIK DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Die funktionelle Ähnlichkeit mancher Komplementkomponenten wie z.B. FH und C4BP oder C2 und FB spiegelt sich auch in ihrer genetischen Lokalisation. So liegen die erwähnten Faktoren gekoppelt auf gleichen Chromosomenbereichen: 1q32 bzw. 6p. Ob diese regulatorische Einheiten sind, kann nur spekuliert werden; daß diese Organisation Hinweise auf die Evolution der Komplementkomponenten gibt, ist dagegen naheliegend. Dafür spricht auch der modulartige Bau vieler Komplementfaktoren aus sich wiederholenden Struktureinheiten, die meistens von einzelnen Exons kodiert werden.

1.4.1 GENETISCHE LOKALISATION UND GENSTRUKTUR WICHTIGER KOMPLEMENTFAKTOREN

Der größte Teil der Komplementfaktoren ist in zwei Komplexen organisiert: dem RCA-Komplex auf Chromosom 1q32 und der Klasse III-Region des MHC auf Chromosom 6p. Im erstgenannten befinden sich die Gene vieler Komplementregulationsproteine, daher auch der Name RCA (regulators of complement activation), auf Chromosom 6 sind die Gene für C4, C2 und FB lokalisiert. Der genetisch kartierte Teil des RCA-Komplexes erstreckt sich über eine Länge von ca. 700 kb und enthält in Tandemanordnung die Gene für MCP, CR1, CR2, DAF, C4BPA und C4BPB (siehe Abbildung 4). In der selben Region, jedoch bisher nicht genetisch kartiert, liegen in einer Entfernung von ca. 22,5 Haldane cM (sex averaged) die Gene für FH, FHRP1 und 2. Sie wurden auf ein 650 kb großes DNS-Fragment lokalisiert (Rey-Campos et al., 1990; Skerka et al., 1995). Die Klasse III-Region des MHC umfaßt unter anderem eng gekoppelt auf einem 120 kb Fragment die Komplementgene C4A, C4B, C2 und FB.

Manche Komplementgene sind auch paarweise angeordnet: so liegen die Gene für C1r und C1s ebenso eng gekoppelt wie C6 und C7 auf Chromosom 12 und C5 und C8 γ auf Chromosom 9. Im Genom verstreut befinden sich die Gene für Properdin (Chr. 12), C9 (Chr. 9), FI (Chr. 4), C11NH (Chr. 11) und schließlich C3 (Chr. 19).

1.4.2 CHARAKTERISTIKA DER GENE UND DER BETREFFENDEN PROTEINE DES RCA-KOMPLEXES

In diesem Kapitel werden nur die Gene, die im RCA-Komplex (siehe Abbildung 4) kartieren besprochen (Hourcade et al., 1989). Die membranständigen Komplementregulatoren DAF und MCP besitzen 4 SCR-Domänen, die für die Interaktion dieser Proteine mit C3b und C4b zuständig sind. Das MCP-Gen besteht aus 14 Exons, wobei SCR2 von zwei Exons kodiert wird. 5' von MCP existiert ein MCP-Pseudogen mit 93% Homologie auf Nukleinsäureebene, das zahlreiche Stopcodons enthält. Das DAF-Gen hat 11 Exons, wobei auch hier ein SCR (SCR3) von zwei Exons kodiert wird. Die Promotorregionen dieser Gene enthält »Haushaltsgen«-typische GC-Inseln stromaufwärts des Transkriptionsstarts, wobei TATA-Boxen fehlen und die CAAT-Box nur bei MCP vorhanden ist. Zwischen MCP und DAF liegen die Gene für CR1 und CR2. Beide kodieren für Rezeptoren für C3b bzw. C3dg/C3g, die in ihrem extrazellulären Bereich ausschließlich aus SCR-Domänen aufgebaut sind: im Falle von CR1 aus bis zu 30 und von CR2 aus 16. Von CR1 existieren 2 Allotypen, die sich in der Anzahl der SCR-Domänen unterscheiden. Im CR1-Molekül sind die einzelnen SCR-Domänen in größeren funktionellen Einheiten – den LHR (long homologous repeat) – zusammengefaßt. Von CR1 existiert ein Pseudogen (CR1-like), das zwischen MCP und dem MCP-Pseudogen lokalisiert ist.

Die extrazelluläre Domäne von CR2 wird von 15 Exons kodiert, die sich, je nach Anzahl der kodierten SCR-Domänen, in drei Gruppen einteilen lassen. Vier der Exons kodieren für jeweils zwei SCR-Domänen, 5 Exons für jeweils ein einzelnes und sechs Exons für insgesamt drei SCR-Domänen.

Stromaufwärts von DAF liegen die Gene, die für C4BP A und B kodieren und zwei C4BP A-Pseudogene (C4BPA like1 und 2; Heine-Suner et al., 1997). Die betreffenden Proteine sind lösliche Heptamere aus C4BPA-Einheiten und einer C4BPB-Untereinheit. Jede C4BP-Untereinheit besteht aus 8 SCR-Domänen und einer zur Ausbildung von Disulfidbrücken fähigen Domäne, die für die Interaktion mit den anderen 6 Ketten zuständig ist. C4BPB ist aus drei SCR-Domänen zusammengesetzt.

Alle hier beschriebenen Gene weisen Eigenschaften auf, die auf eine gemeinsame Entstehung hinweisen: sie liegen gekoppelt und sind in Tandemorientierung angeordnet (Rey-Campos et al., 1988). Alle kodieren für Proteine die durch SCR-Domänen charakterisiert sind und komplementregulatorisch mit C3/C4 interagieren. In den meisten RCA-Proteinen befinden sich die C3/C4-Bindestellen in den N-terminalen SCR, während die restlichen SCR vermutlich strukturelle Funktion haben und für Flexibilität im Molekül sorgen. SCR-Domänen werden meist, wie bei FH, von je einem Exon kodiert. Sie können aber auch, wie bei CR2, von zwei Exons bzw. zwei SCR-Domänen von einem Exon kodiert werden. Der modulartige Aufbau aller RCA-Proteine aus funktionellen und strukturellen SCR-Domänen und deren hohe Homologie spricht dafür, daß Duplikationsereignisse eine große Rolle bei der Entstehung der RCA-Gene spielten. Ein weiterer Hinweis darauf sind die Pseudogene, die bisher für MCP, CR1 und C4BPA gefunden wurden. In der folgenden Abbildung ist die genetische Organisation des telomerischen RCA-Komplexes mit den Genen MCP, CR1 like, MCP like, CR1, CR2, C4BPA like1, C4BPA like2, C4BPA und C4BPB und des zentromerischen RCA-Komplexes mit den Genen HF1, HF3 und F13B dargestellt. Die Genkomplexe C4BP/MCP und HF1/F13B sind ca. 22,5 Haldane cM voneinander entfernt (Heine-Suner et al., 1997).

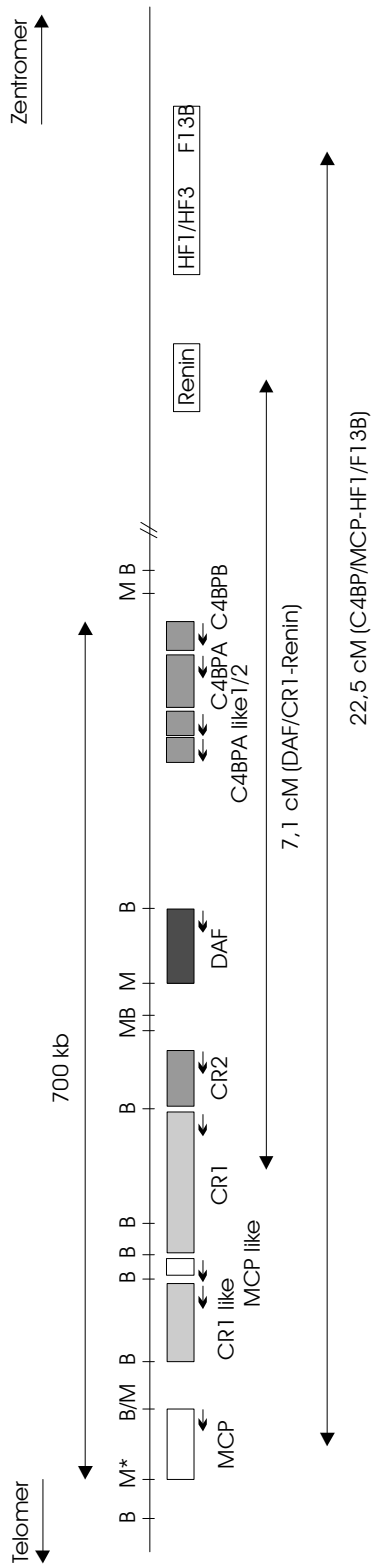


Abbildung 4: Genetische Karte des telomerischen und zentromerischen RCA-Komplexes.

Der telomerische RCA-Genkomplex ist sehr gut charakterisiert. Er umfasst die Gene kodierend für MCP, CR1, CR2, DAF und die beiden C4BP-Untereinheiten A und B. Außerdem sind hier die Pseudogene MCR like, CR1 like und C4BPA like 1 und 2 lokalisiert. Die Gene sind als Kästchen unter der Restriktionskarte dargestellt. Die Orientierung der Gene ist durch Pfeile unter den Kästchen angezeigt, wobei die Pfeilspitze in Richtung 3'UT weist. Der telomerische RCA-Komplex erstreckt sich über ca. 700 kb. Die Lokalisation des zentromerischen RCA-Genkomplexes, der die Gene für HF1, HF3 und in naher Nachbarschaft F13B umfasst, liegt genetisch kartiert ca. 22,5 Haldane cM entfernt (die Entfernung ist nicht maßstabsgetreu dargestellt). Die drei Gene wurden auf ein 650 kb großes DNS-Fragment lokalisiert (Rey-Campos et al., 1990, Skerka et al., 1995). Die Orientierung der Gene ist nicht bekannt.

1.5 KOMPLEMENTAKTIVIERUNG UND PATHOLOGISCHE PROZESSE

Neben all den oben genannten positiven Wirkungen der Komplementaktivierung, gibt es eine Reihe von unerwünschten Effekten, die meist in Zusammenhang mit Erkrankungen des Immunsystems auftreten. So kommt es bei verschiedenen Krankheiten, die mit verstärkter Bildung von Immunkomplexen einhergehen wie bei systemischem Lupus erythematoses (SLE) und rheumatischer Arthritis (RA), zur komplementvermittelten Zerstörung von Membranen, auf die sich Immunkomplexe abgelagert haben. Auch bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS wird eine Beteiligung des Komplementsystems nicht ausgeschlossen. Bei der Alzheimerschen Erkrankung ist zum Beispiel bekannt, daß das abgelagerte β -Amyloid Komplement aktiviert und in Patienten mit Multipler Sklerose (MS) findet man in den für die Krankheit charakteristischen, demyelinisierten Plaques Komplementproteine. Bevor jedoch im weiteren genauer auf diese Krankheiten eingegangen wird, wenden wir uns zuerst den pathologischen Prozessen zu, die durch Mangel an Komplement verursacht werden.

1.5.1 KOMPLEMENTMANGEL-SYNDROME

Die meisten angeborenen Komplementmangelkrankheiten sind sehr selten. Defizienzen im klassischen Aktivierungsweg wie C1q-, C2- oder C4-Mangel, wobei C2-Defizienz mit einer Häufigkeit von 1:30.000 (Europäer) am häufigsten auftritt, führen zu vermehrten bakteriellen Infektionen und Immunkomplexkrankheiten der Betroffenen. Ein Teil der Personen ist jedoch, wie auch bei den übrigen Komplementmangelzuständen, symptomfrei.

Verminderte MBL-Serumspiegel, die man beobachtet, wenn sich Mutationen in der Kollagendomäne des Moleküls befinden, führen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegen Infektionskrankheiten (Sumiya und Summerfield, 1997).

Ist der alternative Aktivierungsweg betroffen, durch z.B. Mangel an FB, FD oder Properdin, zeigt sich vor allem eine erhöhte Anfälligkeit für Neisserieninfektionen.

Mangel an C3, also den MBL-Weg, den alternativen und klassischen Weg betreffend, führt zu schweren, sich wiederholenden bakteriellen Infektionen, oft einhergehend mit Immunkomplexkrankheiten.

Die Krankheitsbilder, die mit Mangel in den terminalen MAC-Komponenten der Komplementkaskade einhergehen, sind recht unterschiedlich im Schweregrad, je nach fehlendem Faktor. Alle sind aber mit einer erhöhten Anfälligkeit für Neisserieninfektionen verbunden. C5-Mangel ist am schwerwiegendsten, da hier weder der terminale MAC noch das wichtige Anaphylatoxin C5a gebildet werden können.

Mangel an C6, C7 und C8 sind bei 25% der Betroffenen symptomlos, es kommen aber auch Fälle mit Immunkomplexkrankheiten vor. Sehr selten im europäischen Raum ist das Fehlen der letzten Komplementkomponente C9. In Japan dagegen kommt es mit einer Häufigkeit von 1:1000 vor und ist symptomlos. Neben den angeborenen Komplementmangelkrankheiten gibt es auch erworbene Defizienzen, oft als Folge von bakteriellen Infektionen, die die Bildung von Autoantikörpern auslösen. Manche dieser Autoantikörper, auch nephritische Faktoren (z.B. C3NeF, C4NeF) genannt, sind fähig die C3- und C5-Konvertasen zu stabilisieren. Dies führt zur Überaktivierung der Komplementwege und zur sekundären Defizienz an C3 und C2 bzw. C3 und C2.

Ursache für die eben beschriebenen Symptome ist eine primäre oder sekundäre Komplementdefizienz. Bei den nun folgenden Krankheiten ist die Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese weniger klar umrissen.

1.5.2 KOMPLEMENT UND KRANKHEITEN

In den folgenden zwei Kapiteln wird auf die Beteiligung des Komplementsystems an zwei Krankheitskomplexen, rheumatische Arthritis und Erkrankungen des ZNS am Beispiel von Multipler Sklerose und Alzheimer, die für diese Arbeit relevant sind, eingegangen. Diese Krankheiten sind nur ein kleiner Ausschnitt aus dem Spektrum von Krankheiten, bei denen das Komplementsystem involviert ist. Zu nennen seien nur die wichtigsten: Nephritiden und SLE neben verschiedenen Hauterkrankungen wie Pemphigus, Urticaria, Psoriasis und Vitiligo.

1.5.2.1 KOMPLEMENT UND RHEUMATISCHE ARTHRITIS (RA)

RA ist eine multifaktoriell bedingte, chronisch entzündliche Erkrankung der Gelenke. Das entzündungsauslösende Agens ist bisher noch nicht identifiziert. Im entzündeten Gelenk findet man eine verdickte Synovialmembran, verursacht zum einen durch Proliferation der Synovialzellen, zum anderen durch Einwanderung von Entzündungszellen (T-, B-Zellen und Makrophagen). Es kommt außerdem zur Ansammlung von Flüssigkeit im Gelenkzwischenraum, in der man ebenfalls Entzündungszellen und große Mengen an Immunkomplexen findet. Diese Immunkomplexe bestehen aus IgG-Antikörpern (z.B. gegen Kollagen Typ II, Cremer et al., 1998) und den Rheumafaktoren (IgM-Antikörper gegen den F_c-Teil von IgG) oder aus Antigen-Antikörper-Komplexen.

Hier kommt das Komplementsystem ins Spiel: wie schon mehrfach erwähnt, aktivieren Immunkomplexe den klassischen Komplementweg, was in diesem Fall jedoch eher mit negativen Folgen einhergeht. So werden durch die Anaphylatoxine die Entzündungsreaktionen verstärkt

und durch den MAC bereits geschädigte Synovialzellen noch stärker beeinträchtigt. In vitro wurde gezeigt, daß von MAC nicht-lethal angegriffene Synovialzellen mit Bildung von z.B. reaktiven Sauerstoffspezies und Prostaglandinen reagieren (Morgan, 1990). Dies führt zu einer Verstärkung der Entzündung (siehe Abbildung 5).

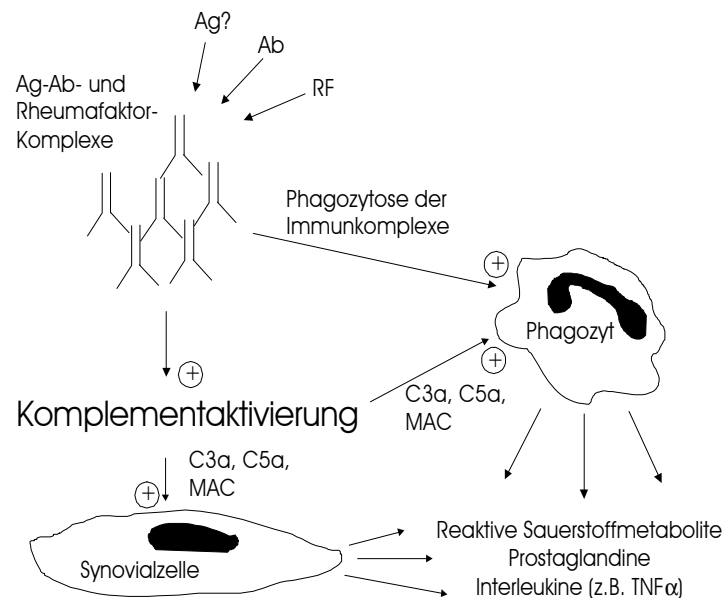


Abbildung 5: Die Rolle der Komplementaktivierung bei rheumatischer Arthritis.

Abkürzungen: Ab=Antikörper, Ag=Antigen, RF=Rheumafaktor, MAC=Membranangriffskomplex.

Eine Aktivierung des alternativen Weges könnte über bakterielle Strukturen erfolgen, die sich nach einer Infektion im Gelenk befinden. Bakterielle Fragmente und Komplementaktivierung findet man als Verursacher von akuter allergischer Arthritis in verschiedenen Tiermodellen. Kaninchen, die mit BSA in komplettem Freund's Adjuvans (KFA: Mineralöl mit abgetöteten Mykobakterien) immunisiert werden und 2-3 Wochen später die selbe Kombination in ein Gelenk injiziert bekommen, entwickeln dort eine Gelenkentzündung, die sehr ähnlich zu RA ist. Dekomplementierung der Tiere mit Kobragift (CVF, cobra venom factor) vor der intraartikulären Injektion verhindert die Ausprägung des Krankheitsbildes. Ebenso entwickeln C6-defiziente Kaninchen keine RA-ähnlichen Symptome bei dem eben beschriebenen Tierversuch. Bei dieser Krankheitsform scheinen also das Komplementsystem und die Bildung des MAC eine entscheidende Rolle zu spielen.

Eine Dekomplementierung ist beim Menschen nicht durchführbar, jedoch bekommt man Anhaltspunkte über die Involvierung des Komplementsystems bei RA aus Untersuchungen von Serum und Synovialflüssigkeit Betroffener. Man findet veränderte Werte verschiedener

Komplementproteine: die allgemeine Komplementaktivität ist im Serum normal oder erhöht, in der Synovialflüssigkeit dagegen erniedrigt. Dies spricht für einen Verbrauch von Komplement im entzündeten Gelenk. Die Entzündungsreaktion scheint also so stark zu sein, daß die Kontrolle der Komplementaktivierung nicht mehr effizient ist. Daß eine Kontrolle erfolgt, machen die erhöhten Werte an C1-C1INH-Komplexen und FI deutlich (Gonzales-Rubio, 1997). Desweiteren findet man C3- und MAC-Deposition sowie eine verminderte Anzahl von CD59 (Protectin) auf der Oberfläche der Synovialzellen (Konttinen et al., 1996). Aktivierung von Komplement geht also gleichzeitig mit einer Verminderung des Schutzes der Synovialzellen gegen MAC einher. Es gibt also auch beim Menschen Hinweise auf die Beteiligung des Komplementsystems an der Entstehung von RA.

Uns interessierte insbesondere die Rolle von FHRP1, das wie bereits erwähnt eine mögliche Rolle bei der LPS-induzierten CD14/Integrin-vermittelten Neutrophilenadhäsion an Endothelzellen spielt (Park und Wright, 1996). Dies veranlaßte uns Patienten mit RA in Hinblick auf die Häufigkeit der HF2-Deletion zu untersuchen (Kap. 5.3).

1.5.2.2 KOMPLEMENT UND KRANKHEITEN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

Das Gehirn galt lange Zeit als ein Organ, in dem Immunreaktionen nur in geringem Umfang ablaufen (immune privileged site: Baker und Billingham, 1977). Belegt wurde diese Annahme durch seine Isolierung durch die Blut-Hirn-Schranke, bestehend aus von spezialisierten Endothelzellen ausgekleideten Mikrogefäßen. Durch diese ist im gesunden Zustand ein Übertritt von Immunzellen und Makromolekülen aus dem Blut ins Gehirn nicht oder nur selektiv möglich. Das bedeutet, daß Komplementfaktoren aus dem Serum nicht ins ZNS gelangen können. Desweiteren werden auf Neuronen und Gliazellen (Oligodendrozyten, Astrozyten und Microglia) nur in geringem Umfang Moleküle der HLA Klasse I und II, Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle exprimiert und es findet keine Lymphdrainage statt. Dies alles spricht dafür, das ZNS als wenig immunkompetentes Organ zu betrachten. Dennoch verfügt das Gehirn über ein »eigenes Immunsystem«: Microglia und Astrozyten besitzen phagozytierende Aktivität und können zu geschädigten Hirnarealen wandern und dort tätig werden (Fabry et al., 1994). Reaktive Astrozyten, wie man sie bei MS und anderen neurodegenerativen Erkrankungen findet, sind in der Lage Perforin, ein charakteristisches Produkt cytotoxischer T-Zellen, zu exprimieren (Gasque et al., 1998). Desweiteren sind die Gliazellen zur Synthese von Komplementfaktoren und nach Aktivierung auch zur Bildung von Cytokinen fähig (Gasque et al., 1993 und 1995; Morgan et al., 1996; Zhao und Schwartz, 1998). In der Tat findet man Komplementaktivierung in Gehirn bei bestimmten entzündlichen, degenerativen und traumatischen Prozessen. Als Hauptquelle der Komplementfaktoren wurden die Astrozyten identifiziert (Levi-Strauss und Mallat, 1987;

Gasque et al., 1995; Shrikant und Benveniste, 1996). Komplementrezeptoren und Regulatoren wurden hier und ebenfalls auf anderen Zellen des ZNS gefunden (Gasque et al., 1995). Diese Befunde sprechen für eine Aufgabe des Komplementsystems und der Komplementregulatoren wie z.B. FH bei der Immunabwehr des ZNS, legen aber ebenso eine Beteiligung an pathologischen entzündlichen Prozessen nahe. Als Beispiele für die Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese von Krankheiten des ZNS werden im folgenden MS und Alzheimer kurz vorgestellt.

1.5.2.2.1 KOMPLEMENT UND MULTIPLE SKLEROSE

MS ist, mit einer Häufigkeit von 1:1000 in gemäßigten Klimazonen auftretend, eine der häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Das Krankheitsbild umfaßt motorische und sensorische Störungen, zuweilen auch psychische Beeinträchtigungen, die sich chronisch verschlimmern oder schubweise verlaufen, mit teilweise völliger Rückbildung der Symptome. Hervorgerufen werden diese Defekte durch multifokale Demyelinierungs- und Entzündungsreaktionen im ZNS. Das Immunsystem spielt bei der Entstehung von MS eine große Rolle: so findet man in Patienten Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen gegen Proteine des ZNS, vor allem gegen Myelin. Die Ursache dieser Autoaggression des Immunsystems gegen das ZNS ist unbekannt, diskutiert werden Autoimmunität gegen myelinspezifische Proteine und latente Virusinfektion des ZNS (Sayetta, 1986).

Wie bei RA ist auch hier das Tiermodell ein besseres Untersuchungsmodell. Die Immunisierung von Ratten mit ZNS-Gewebe in komplettem Freund's Adjuvans führt zur experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE), einer Erkrankung mit MS-ähnlichen Symptomen (Kies, M.W., 1978). Komplementdepletierung mit CVF führt in diesem Modell, ähnlich zu dem vorher beschriebenen Tiermodell von RA, zu einer drastischen Verminderung der Symptome (Morgan, 1989). In MS-Patienten beobachtet man Immunkomplexe in Hirngewebe und Liquor und eine verstärkte Komplementaktivierung, bis zur Entstehung des MAC (Morgan, 1990). Da jedoch bei MS eine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt, können zusätzlich zu den im Hirn gebildeten Faktoren noch Komplementproteine auch aus dem Serum rekrutiert werden (Gay und Esiri, 1991). In vitro Versuche zeigen, daß Oligodendrozyten extrem komplementsensitiv sind. Es bleibt jedoch zu demonstrieren, daß die Aktivierung des Komplementsystems entscheidend an der Pathogenese der MS mitwirkt. Kommen wir nun zur Alzheimerschen Erkrankung, der häufigsten Form von Altersdemenz.

1.5.2.2.2 KOMPLEMENT UND ALZHEIMER

Bei der Alzheimerschen Erkrankung, die durch fortschreitende Demenz charakterisiert ist, lagert sich β -Amyloid in Form von Plaques im Gehirn ab. β -Amyloid selbst aktiviert, indem es an C1q bindet, den klassischen Komplementweg, was zur Beeinträchtigung und Schädigung der umliegenden Neuronen führt (Akiyama et al., 1991; Jiang et al., 1994; Rogers et al. 1992). Im Gegensatz zu MS gibt es bei Alzheimer keinen Hinweis auf Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, so daß man davon ausgehen kann, daß nur die im ZNS selbst gebildeten Komplementfaktoren aktiviert werden. Vergleicht man die Transkriptmenge von C3 und C4 in Gehirngewebe erkrankter und gesunder Personen, so findet man eine dreifach erhöhte Menge bei Alzheimerpatienten (Walker und McGeer, 1992). Daß die Komplementaktivierung bis zur terminalen Bildung des MAC läuft, wurde über Immunhistochemie nachgewiesen: MAC findet sich in den Alzheimer-Plaques (McGeer et al., 1989). Alle diese Befunde sprechen für eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese von Alzheimer.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

2.1 GENOMISCHE ORGANISATION DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Die Hauptaufgabe der Arbeit bestand in der Aufklärung der genomischen Organisation der Faktor H-Genfamilie. Bekannt war bisher nur die ungefähre chromosomale Lokalisation auf 1q32 von FH und eines der FH verwandten Gene (HF3). Daneben standen Restriktionskarten von Bereichen aus dem HF-Gen, von HF2 und HF3 zur Verfügung. Ziel war zum einen die Restriktionskartierung der genomischen Region mit Hilfe von humanen Mega YAC-Klonen und BAC-Klonen (Research Genetics), zum anderen die Aufklärung der Genanordnung der HF-Familie und deren Kopplung mit bekannten Genen. Die Lage der Gene zueinander kann Aufschluß über das Entstehen und die Evolution der HF-Genfamilie geben.

2.2 DELETIONEN UND GENORGANISATION DER GENE HF2 UND HF3

Aus früheren Untersuchungen (Estaller, 1991; Cannich, 1994) war bekannt, daß das von HF2 kodierte Protein FHRP1 bei einem kleinen Prozentsatz, ca. 4-5% der untersuchten Probanden, nicht im Westernblot nachweisbar ist. Manche untersuchten Probanden tragen eine Deletion auf DNS-Ebene im HF2-Gen (Cannich, 1994). Diese Prozentzahlen wurden hier in einem größeren Kollektiv bestätigt. Im untersuchten Material befand sich auch erstmals ein Proband, bei dem FHRP1 und FHRP2 nicht nachweisbar waren. Im Southernblot soll untersucht werden, ob dieser Phänotyp auf Deletionen in den betreffenden Genen zurückzuführen ist.

Der Befund der Gendeletion, zusammen mit der kürzlich von Park et al. (1996) beschriebenen möglichen Rolle von FHRP1 bei der LPS-induzierten intergrinvermittelten Neutrophilenadhäsion, veranlaßte uns die Häufigkeit der HF2-Deletion bei Patienten mit rheumatischer Arthritis zu untersuchen. Das Ergebnis könnte Hinweis auf die Funktion des von HF2 kodierten Proteins geben und einen möglichen Phänotyp der homozygoten und heterozygoten Deletionsträger aufdecken.

2.3 EXPRESSION DER FAKTOR H-GENFAMILIE IM GEHIRN UND IN GLIOMAZELLINIEN

Die meisten Proteine der Komplementaktivierungswege (Ausnahme C4BP) und des MAC wurden in humanen Gehirnzelllinien und teilweise in verschiedenen Gehirnarealen nachgewiesen. Wir untersuchten hier die Expression der HF-Genfamilie in Liquorproben, verschiedenen Gliomazelllinien und unterschiedlichen Gehirngeweben. Zudem wurde die Stimulation der Genexpression mit IFN γ , IL4 und IL6 von HF1 und den HF1-verwandten Genen in diesen Zellen untersucht.

3 MATERIAL

3.1 ABKÜRZUNGEN

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Akute-Phase-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	american type culture collection
BAC	bacterial artificial chromosome
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
C1-INH	C1-Inhibitor
C4BP	C4 bindendes Protein
CD	cluster of determination
cDNS	komplementäre DNS
cM	centi Morgan (1% Rekombinationshäufigkeit; entspricht ca. 1 Million bp beim Menschen)
CR1	Komplementrezeptor 1 für C3b (CD35)
CR2	Komplementrezeptor 2 für C3dg/C3g (CD21)
CR3	Komplementrezeptor 3 für iC3b (CD11b/CD18)
CR4	Komplementrezeptor 4 für iC3b (CD11c/CD18b)
CVF	cobra venom factor
DAF	decay accelerating factor
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F _{ab}	antigenbindendes Fragment
F _c	komplementbindendes Fragment
FB	Faktor B
FCS	fötales Kälberserum
FH	Faktor H
FHRP	Faktor H-verwandtes Protein
FI	Faktor I
GTE	Glukose-Tris/HCl-EDTA Lösung
GPI	Glycophosphoinositol

HFR	homologous restriction factor
HUS	hämolytisches urämisches Syndrom
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IAA	Isoamylalkohol
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL1	Interleukin 1
IL4	Interleukin 4
IL6	Interleukin 6
IFN γ	Interferon γ
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LBP	lipopolysaccharidbindendes Protein
LHR	long homologous repeat
LPS	Lipopolysaccharid
LOS	Lipooligosaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MACIF	MAC inhibierender Faktor
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
Mbp	Megabasenpaare
MCP	Membran Cofaktor Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MIP	MAC inhibierendes Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)
MS	Multiple Sklerose
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PF	Pulsfeld
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RA	rheumatische Arthritis
RCA	Regulatoren der Komplementaktivierung
RGD	adhäsionsvermittelndes AS-Motiv (Arg-Gly-Asp)
RF	Rheumafaktor
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rothwell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCR	short consensus repeat
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
SLE	systemischer Lupus erythematoses

T _A	Anlagerungstemperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	Tris-EDTA-RNase A Puffer
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
UT	untranslatierte Region
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galaktosid
YAC	yeast artificial chromosome
ZNS	zentrales Nervensystem

3.2 GERÄTE

automatische Sequenzierapparatur 373A ALFexpress™ DNA Sequencer	Applied Biosystems (ABI), Weiterstadt Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Blottingapparatur	LKB Electrophoretic Transfer Unit 2051 Midget Multiblot, Bromma
PFGE-Geräte:	
Elektrophorese Einheit 2015 Pulsaphor	Pharmacia LKB
Pulsgeber GN Controller	Pharmacia LKB
Spannungsgerät 2301 Makrodrive 1	LKB Bromma
SDS-Gelapparatur	Novex, X-Cell, Anamed, Offenbach
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, USA
Ultra-Turrax	Janke&Kunkel, Ika-Werk
UV-Transilluminator (314 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Zentrifugen	Megafuge 1.0, Megafuge 1.0R, Suprafuge 20, Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, Osterode Mikrozentrifuge, Bachhofer, Reutlingen

3.3 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL

Adenin Hemisulfat	Sigma, St. Louis, USA
Agarose für PFGE:	
LM-MP Agarose	Boehringer Mannheim, Mannheim
MP Agarose	Boehringer Mannheim, Mannheim
Blocking Reagenz	Boehringer Mannheim, Mannheim
Casein (säurehydrolysiert)	USB/Amersham

CDP Star	Tropix, Bedford, Mass., USA
Dodecylsulfat-Li-Salz (25%)	Serva, Heidelberg
RPMI 1640	PAA Laboratories, Linz, Austria
FCS	BIO Whittaker, Verviers, Belgien
Oligo(dT) ₁₅₋₁₈ Primer	GIBCO BRL Life Technologies, Paisley, GB
Marker (1-kb-Leiter)	GIBCO BRL Life Technologies, Paisley, GB

Protran BA85 Cellulosenitrat-Membran	Schleicher und Schüll, Dassel
Nylonmembran Hybond N u. N+	Amersham Life Science, Buckinghamshire, GB
Yeast nitrogen base (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)	Difco, Augsburg

Verwendete Längenstandards (Angaben in Basenpaaren):

a) 1-kb-Marker

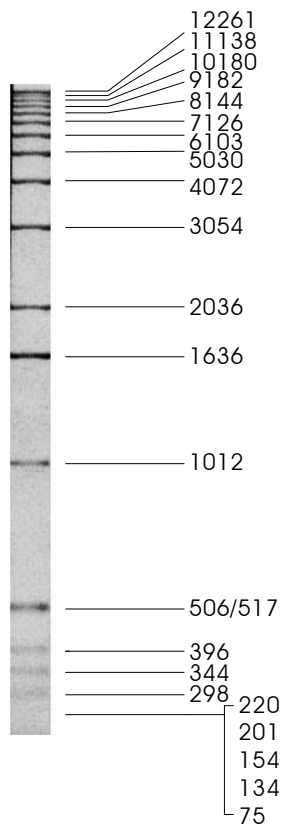


Abb. 6: 1-kb-Marker
(Gibco BRL)

b) BAC-Marker

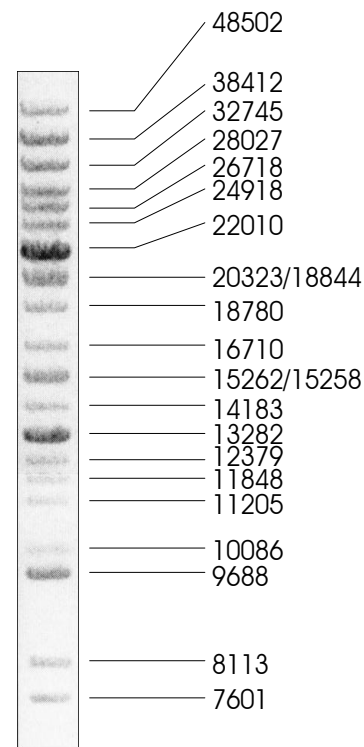


Abbildung 7: BAC-Marker
(ExpandDNAMWM, Boehringer Mannheim)

c) Lambda-Concatemere für PFGE mit YAC-DNS (PFGE Marker I λ ladder; Boehringer Mannheim): Dieser Längenstandard liegt als Blöckchen vor. In die Geltasche wird ein kleines Stück (ca. 1 mm) des Blöckchens geladen. Dieses Markerstück sollte vor Beladen 30 min in Laufpuffer bei 4°C äquilibriert werden. Die Markerbanden sind die Größe von Lambda: 48,5 kb und Vielfache dieser Größe.

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden beim jeweils preisgünstigsten Hersteller bezogen.

3.4 KITS

TA Cloning Kit

Invitrogen Corporation, San Diego, USA

Sequenzierkits:

1. Für ABI-Sequenziergerät: Dye terminator cycle sequencing ready reaction

Applied Biosystems (ABI), Weiterstadt

2. ALFexpress-Sequenziergerät: Thermo sequenase fluorecence labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP

Amersham Life Science

Nucleo Spin (Plasmidisolierung)

Machery und Nagel, Düren

HighPure™ PCR Product Purification Kit

Boehringer Mannheim, Mannheim

Nucleon™ GX (DNS Isolierung aus Gelen)

Amersham Life Science, Buckinghamshire, GB

Plasmid Midi Kit

Qiagen, Hilden

Expand™ Reverse Transkriptase Kit

Boehringer Mannheim, Mannheim

DIG DNA labelling Kit

Boehringer Mannheim, Mannheim

Western-Light™ Chemiluminescent

Tropix Inc., Bedford, USA

Detection System

3.5 ENZYME

3.5.1 RESTRIKTIONSENZYME

Bam HI New England Biolabs (NEB), Beverly, New England, USA

BssH II AGS, Heidelberg

Bst X I NEB

Hind III NEB

Eag I NEB

EcoR V NEB

Mlu I NEB

Not I NEB

Sal I NEB

Sfi I Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Sac II NEB

Xho I Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Pvu II NEB

Für den Restriktionsverdau wurde das 10x Puffersystem von Boehringer Mannheim verwendet.

3.5.2 SONSTIGE ENZYME

RNase A	Boehringer Mannheim, Mannheim
Zymolyase: Novozym™ 234	Calbiochem, La Jolla, USA
Proteinase K	Amresco, Solon, USA
Expand™ Reverse Transkriptase (50 U/μl)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Klenow Polymerase (2 U/μl)	Boehringer Mannheim, Mannheim
AmpliTaq DNS-Polymerase (4 U/μl)	Perkin Elmer, Branchberg, USA
AccuTac LA DNA Polymerase Mix	Sigma, St. Louis, USA

3.6 OLIGONUKLEOTIDE UND PCR-BEDINGUNGEN

Alle aufgeführten Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die PCR-Amplifikationen und Sequenzierreaktionen (cycle sequencing) wurden im Thermocycler GeneAmp 9600 von Perkin Elmer durchgeführt. Angaben zur MgCl₂-Konzentration, bei der die PCR-Amplifikation durchgeführt wurde und die Anlagerungstemperatur (T_A) sind in den folgenden Tabellen angegeben. Die kleingedruckten Basen stehen für Überhänge, die aus klonierungstechnischen Gründen an die Oligonukleotide angefügt wurden.

3.6.1 OLIGONUKLEOTIDE ZUR PCR-AMPLIFIZIERUNG VON HF1-SEQUENZEN

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
HF1-1s	GACCAAACATATCCAGAAGGC	1,5 mM	57°C
HF1-2as	GATCTGGTTCATTGCACTAC	1,5 mM	57°C
HF1-6s	GGATCACATTCATTGCACAC	1,5 mM	54°C
HF1-6as	GTGTGCAATGAATGTGATCC	1,5 mM	54°C
HF1-7as	ttactgCAGCCATTCTCCATACATGT	1,5 mM	54°C
HF1-10s	TGGAGAGGTGTTGAAATTCT	2,0 mM	56°C
HF1-11as	CACTCTCCATCAACACATTG	2,0 mM	56°C
HF1-14s	TCTCACAATATGACAACCAC	1,5 mM	56°C
HF1-15s	TGCACATGGGACTAAATTGAG	1,5 mM	56°C
HF1-16s	CTCCACCTGAGATTTCTCA	1,5 mM	54°C
HF1-16as	CTGTCTGACATGTGAGCTAC	1,5 mM	56°C
HF1-17as	GTTACATACTGGCTCCATCC	1,5 mM	54°C
3'UTas	GTTCTGAATAAAGGTGTGCA	1,5 mM	54°C

3.6.2 OLIGONUKLEOTIDE ZUR PCR-AMPLIFIZIERUNG VON HF2-SEQUENZEN

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
pHF1.4L-s	tatctgcAGCATGTGGCTCCTGGTCAG	1,5 mM	57°C
SCR1s	CCATGGAATTCTATATGATGAAG	1,5 mM	58°C
SCR1as	CTTCATCATATAGAATTCCATGG	1,5 mM	58°C
SCR2s	agtcgACATCTGGAAGGTGATACTG	1,5 mM	58°C
SCR2as	tatctgCAGTATCACCTTCCAGATGTG	1,5 mM	58°C
SCR3s	tatctgcaGATGAAGAAGTGATGTGT	1,5 mM	45°C
SCR3as	acgtcgACACATCACTTCTTCATC	1,5 mM	54°C
SCR3as intron	TAACCCTGCTATACTCCC	1,5 mM	52°C
SCR4s	CGTTGTCAGTATATGCTCCAG	1,5 mM	54°C
SCR5s	CCGTGTGTAATATCCCGAG	1,5 mM	54°C
3'UTas	GTTCTGAATAAAGGTGTGCA	1,5 mM	54°C

3.6.3 OLIGONUKLEOTIDE ZUR AMPLIFIZIERUNG VON HF3-SEQUENZEN

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
SCR1s (auch HF2)	CCATGGAATTCTATATGATGAAG	1,5 mM	58°C
SCR1as (auch HF2)	CTTCATCATATAGAATTCCATGG	1,5 mM	58°C
HF3 SCR2s	CACATCTGGAAGGTGATACTGTA	1,5 mM	61°C
SCR2as (auch HF2)	tatctgCAGTATCACCTTCCAGATGTG	1,5 mM	59°C
HF3 SCR4as	CCTGGAGCATATACTGACAACA	1,5 mM	59°C

3.6.4 OLIGONUKLEOTIDE ZUR AMPLIFIZIERUNG VON HF4 UND HF5-SEQUENZEN

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
HF4-SCR4s	AGCAATGGTGATACCACCTC	2,5 mM	55°C
HF4-SCR5as	TCTGTCACCTTCTTCCTTTTAAC	2,5 mM	55°C
HF5-SCR5as	GTCACCTTTTTCCTTTTAACTG	2,5 mM	55°C

3.6.5 OLIGONUKLEOTIDE ZUR AMPLIFIZIERUNG VON NEU IDENTIFIZIERTEN HF1-VERWANDTEN GENSEQUENZEN

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
B20s 1	CTTATAAGAGTTGGATCAGAC	2,0 mM	56°C
B20as 2	CATATTCCACTACTTCATTGTG	2,0 mM	56°C
B20as 3	GACCGTTGGTGACCAACAT	1,5 mM	55°C
B20as 4	ATATCCCAATTTACACATAAATTC	1,5 mM	55°C

3.6.6 OLIGONUKLEOTIDE ZUR AMPLIFIZIERUNG VON F13B

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
F13B-Bs	TGCACATTATCTTTACTGA	1,5 mM	44°C
F13B-Cas	ACATCTTGGATATTTAACT	1,5 mM	44°C

Die Sequenzen der Oligonukleotide zur Amplifizierung von F13B stammen von den Nukleinsäurepositionen 1743-1760 bzw. 1937-1917 (Bottenus et al., 1990).

3.6.7 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE ALU-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
Alu 5'	GGATTACAGGCGTGAGCCAC	1,5 mM	60°C
Alu 3'	GATCGCGCCACTGCACTCC	1,5 mM	60°C
Cl-1	TCCCAAAGTGCTGGGATTACAG	1,5 mM	60°C
Cl-2	CTGCACTCCAGCCTGGG	1,5 mM	60°C

Die Oligonukleotide zur Amplifizierung von Alu-Sequenzen wurden von Lengauer et al., 1990 beschrieben.

3.6.8 YAC-SPEZIFISCHE OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
YL-5'	AAGTACTCTCTCGGTAGCCAA	1,5 mM	60°C
YL-3'	AGTCGAACGCCCGATCTCAA	1,5 mM	60°C
YAC A8 (3-5) 5'	GGTGAGGTCATGTTTTCTG	1,5 mM	55°C

YAC A8 (3-5) 3'	ACAGCATGACTCAGCTTTGG	1,5 mM	55°C
YAC B2 (5-3) 5'	TCAGTATCCAGAGTTCCTGC	1,5 mM	55°C
YAC B2 (5-3) 3'	TCTGTAAATACACCTGGTCC	1,5 mM	55°C
YAC C2 (3-3) 5'	TGGAGACTCCACCTTTACTC	1,5 mM	55°C
YAC C2 (3-3) 3'	AATGCTCGTTACACAGCCTC	1,5 mM	55°C

3.6.9 WEITERE VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	MgCl ₂ -Konzentration	T _A
M13 revers	CAGGAAACAGCTATGAC	1,5 mM	52°C
M13 -20	GTAAAACGACGGCCAG	1,5 mM	52°C
CDM8 5'	CTCTGGCTAACTAGAGAACC	1,5 mM	57°C
CDM8 3'	CAAAGATCCTCTAGAGTCGC	1,5 mM	57°C
HLA-E α3s	CAGCATGAGGGGCTACCCG	1,5 mM	55°C
HLA-E 3'UTas	GTGTGAGGAAGGGGGTCATG	1,5 mM	55°C
Renin 153s	GAGAAAGCCTGAAGGAACGA	1,5 mM	58°C
Renin 616as	CAACCCCATCAAACCTCGGC	1,5 mM	58°C

3.7 ANTIKÖRPER

3.7.1 ANTIKÖRPER GEGEN FAKTOR H UND FAKTOR H VERWANDTE PROTEINE

Bezeichnung u. Herkunft	Spezifität	eingesetzte Verdünnung
anti FH/FHRP1 Serotec, Kidlington, Oxford, UK	polyklonales Kaninchenantiserum, erkennt FH _{gp150} , FH _{p43} und FHRP1	1:5000
anti FHRP1/FHRP2 Dr. Bob Sim, Oxford, UK	polyklonales Kaninchenantiserum, erkennt FHRP1/2	1:1000
anti FH/FHRP1+2 Prof. Linke, MPI für Biochemie, Martinsried	polyklonales Kaninchenantiserum, erkennt FH _{gp150} , FH _{p43} , FHRP1/2	1:2500
MAH 4 Prof. Dierich, Innsbruck, Österreich	monoklonaler Mausantikörper, erkennt FH _{gp150} und FH _{p43}	1:1000

3D11.7 Dr. Koistinen, Helsinki, Finnland	monoklonaler Mausantikörper (Hybridomüberstand), erkennt verschiedene FHRP1 Formen	1:20
--	--	------

3.7.2 ANTIKÖRPERKONJUGATE

Bezeichnung u. Herkunft	Spezifität	eingesetzte Verdünnung
anti DIG-AP, Fab-Fragment Boehringer Mannheim, Mannheim	gegen Digoxigenin gerichtetes Schaf-IgG-Fab-Fragment, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP)	1:20.000
Ziege-anti-Kaninchen-AP Antikörper Tropix, Bedford, USA	Ziegenantikörper gegen Fc-Teil von Kaninchenantikörper gerichtet, mit AP konjugiert	1:14.000
Ziege-anti-Maus-AP Antikörper Tropix, Bedford, USA	Ziegenantikörper gegen Fc-Teil von Mausantikörper gerichtet, mit AP konjugiert	1:7000

3.8 VERWENDETE ORGANISMEN UND VEKTOREN

Im folgenden sind alle verwendeten Vektoren, Bakterien-, Hefestämme und eukaryontischen Zellen sowie ihre Kulturbedingungen aufgeführt.

3.8.1 BAC UND pBELOBAC11

Die BAC wurden durch PCR-Durchsuchen der humanen BAC-Bibliothek der Firma Research Genetics, Huntsville, USA, mit spezifischen Oligonukleotiden identifiziert und schließlich aus 395-Vertiefungsplatten isoliert. Die humane genomische DNS ist in die Hind III-Schnittstelle des Vektors pBeloBAC kloniert. Der Vektor vermittelt Chloramphenicolresistenz. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors pBeloBAC.

BAC-LB-Medium: 10 g Pepton 140 (Amersham Life Technologies)
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
In 1 l deionisiertem Wasser lösen, pH auf 7,5 einstellen und autoklavieren.
Vor Verwendung 12,5 µg/ml Chloramphenicol zugeben.

pBeloBAC11

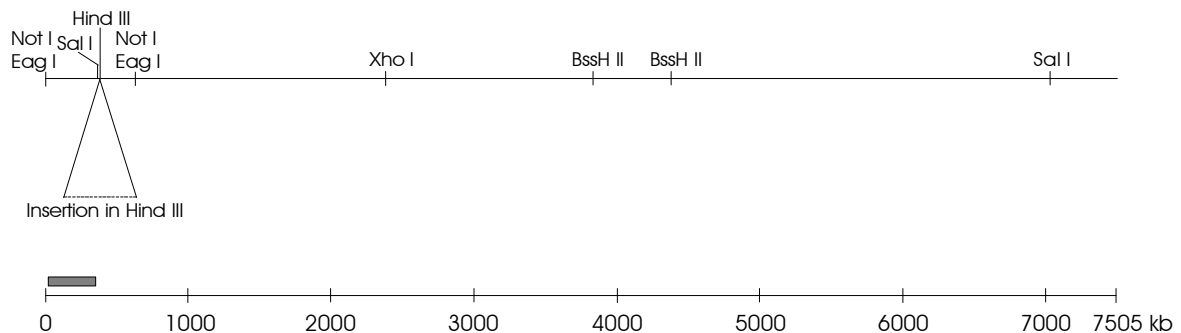


Abbildung 8: Der Vektor ist durch eine Linie symbolisiert, die Insertion befindet sich in der Hind III-Schnittstelle. Das zur Hybridisierung verwendete Vektorfragment ist mit einem Kästchen am Maßstab, der sich unter der Restriktionskarte befindet, gekennzeichnet.

3.8.2 S. CEREVISIAE AB1380 UND pYAC4

S. cerevisiae Stamm AB1380 wird häufig zur Propagierung von YAC benutzt. Sein Genotyp ist Mata, *ura3-52*, *trp1*, *ade2-1*, *lys2-1*, *his5*, *can1-100*.

AB1380 wird zur Selektion auf Anwesenheit des Plasmids pYAC4 in AHC-Medium kultiviert. Zur Differenzierung zwischen Klonen, die nur das Plasmid tragen und denen, die Plasmid plus Insertion (YAC) tragen, setzt man geringe Mengen an Adenin ein (Selektionsmedium mit 20 mg/ml Adenin Hemisulfat). Die Insertion der genomischen DNS erfolgt in die EcoR I Schnittstelle des pYAC4 Vektors. Wenn sich eine Insertion in pYAC4 befindet, d.h. der Klon ein YAC trägt, ist das tRNA Gen für die *ade-2* supprimierende Mutation zerstört, und der Klon wächst bei geringen Adenin-Konzentrationen mit einer rosa Farbe. Klone, die nur das pYAC4 Plasmid tragen, wachsen als weiße Kolonien.

Beim verwendeten *S. cerevisiae* Stamm AB1380 sind 12 der insgesamt 16 Chromosomen (haploid) im Pulsfeld (PF)-Gel sichtbar. Die Größen der Chromosomen sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Chromosom	Größe in kb	Chromosom	Größe in kb
1	1200	7	681
2	1051	8	581
3	936	9	427
4	913	10	335
5	832	11	263
6	774	12	238

AHC-Medium: 1,7 g yeast nitrogen base
5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10 g säurehydrolysiertes Casein
Adeninhemisulfat 20 mg für Selektionsbedingungen
100 mg für Amplifikation

Auf 1 l mit deionisiertem Wasser auffüllen, pH auf 5,8 einstellen und autoklavieren. Vor Verwendung 5 ml 20%ige sterile Glukoselösung pro 100 ml AHC-Medium zugeben.

3.8.3 EUKARYONTISCHE ZELLEN

humane Gliomazelllinien:

Die Zelllinien N59 und N63 wurden freundlicherweise von Dr. Barbara Mayer (Klinikum Großhadern) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie T98G wurde von ATCC erworben.

Kulturbedingungen: Die Zellen benötigen RPMI-Medium mit 10% FCS. Sie sind adhärent und werden mit Trypsin-EDTA abgelöst.

Kulturmedium: RPMI 1640
10% FCS
1 mM Natrium-Pyruvat
50 U/ml Penicillin
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% Trypsin
0,02% EDTA
In PBS, pH 8,0 ansetzen.

4 METHODEN

4.1 ARBEITEN MIT DNS

Um eine Kontamination der DNS mit DNasen zu vermeiden, werden alle verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen durch Autoklavieren sterilisiert.

4.1.1 ISOLIERUNG VON DNS

Im Folgenden werden verschiedene DNS-Präparationsmethoden – von der Plasmid- und BAC-Isolierung, über die Gewinnung genomischer DNS aus Zellen, Gewebe und präparativen Agarosegelen bis hin zur Herstellung von DNS-Blöckchen für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) – beschrieben, die im Rahmen der Arbeit angewandt wurden.

4.1.1.1 PLASMIDISOLIERUNG AUS BAKTERIENZELLEN (KLEINANSATZ)

Zur schnellen Überprüfung von Transformanden wird die Plasmidpräparation nach Chowdhury (1991) durchgeführt. 500 μ l einer Übernachtskultur werden mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (IAA) versetzt, 1 min auf dem Vortexschüttler gemischt und anschließend 5 min bei 12.000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abpipettiert, mit gleichem Volumen Isopropanol gemischt und wie oben zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wäscht man das Plasmid-Präzipitat zweimal mit 70%igem Ethanol, läßt es lufttrocknen, löst es in 50 μ l TER und inkubiert 30 min bei 37°C.

Von der Plasmidpräparation werden 5 μ l in einen geeigneten Restriktionsverdau eingesetzt. Um sequenzierfähige Plasmid-DNS zu erhalten, wird die Präparation mit Hilfe von Nucleo Spin Säulchen von Machery und Nagel nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

TER: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA
 20 mg/ml RNase A

Phenol/Chloroform/IAA: 25:24:1 gemischt

4.1.1.2 PLASMIDISOLIERUNG AUS BAKTERIENZELLEN (MITTELANSATZ)

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNS impft man 50 ml Selektionsmedium für »high copy« Plasmide bzw. 100 ml für »low copy« Plasmide mit einer Bakterienkolonie als Übernachtskultur an. Die weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Plasmid Midi Kit, Qiagen) durchgeführt.

4.1.1.3 ISOLIERUNG VON BAC-DNS

150 ml Übernachtskultur werden auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 3.500 rpm sedimentiert (Megafuge 1.0, Heraeus), in 5 ml GTE-Lösung resuspendiert, mit 6,5 ml frischer NaOH/SDS-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Zur Fällung der Proteine und der genomischen bakteriellen DNS gibt man nun 6,5 ml Kaliumacetat-Lösung zu, mischt, inkubiert 10 min auf Eis und zentrifugiert anschließend 15 min wie oben. Der wäßrige plasmidhaltige Überstand wird abpipettiert, mit gleichem Volumen Isopropanol gefällt und 15 min wie oben zentrifugiert. Das Sediment läßt man kurz lufttrocknen, löst es in 1,5 ml bidest. Wasser, gibt RNase A bis zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml zu und verdaut 45 min bei 37°C. Zur Entfernung der RNase reinigt man die BAC-DNS durch Phenolextraktion: sie wird mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/IAA versetzt, gemischt und 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung von Phenolresten aus dem wäßrigen Überstand wiederholt man den Vorgang mit Chloroform. Die BAC-DNA wird mit 200 mM NaCl und 2 Volumen Ethanol gefällt und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die sedimentierte BAC-DNS wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300 µl TE (10 : 0,1) gelöst.

GTE: 50 mM Glukose
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA, pH 8,0

NaOH/SDS-Lösung: 0,2 M NaOH
 1% SDS

Kaliumacetat: 3,0 M Kaliumacetat, pH 4,8

TE (10 : 0,1): 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA

4.1.1.4 ISOLIERUNG VON DNS AUS HEFEZELLEN

50 ml AHC-Medium (100 mg Adeninhemisulfat pro Liter) werden mit einer rosa Hefekolonie angeimpft und bei 30°C unter Schütteln 2 Tage inkubiert (siehe Kap. 3.8.2). Die Zellen werden

durch Zentrifugation (5 min, 2.500 rpm) geerntet und einmal mit sterilem dest. Wasser gewaschen. Das Sediment wird nun in 5 ml CPES suspendiert, man gibt 1 mg/ml Zymolyase zu und inkubiert bei 37°C für eine Stunde unter gelegentlichem, vorsichtigem Mischen. Die stabile Hefezellwand wird von der Zymolyase angedaut und ist dann leichter zu lysieren. Vor Zugabe des Lysepuffers werden die Hefezellen wie oben zentrifugiert, das Sediment mit 5 ml YLS II ohne SDS versetzt und resuspendiert. Nach Zugabe von SDS mischt man erneut und inkubiert dann bei 50°C für 4 Stunden, anschließend bei 37°C über Nacht. Die DNS-haltige Lösung wird zweimal mit Phenol/Chloroform/IAA und einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Fällung der DNS setzt man dem wässrigen Überstand 0,04 Volumen 5 M NaCl und 1 Volumen Isopropanol zu, mischt und sedimentiert die DNS durch Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm, 4°C). Das DNS-Sediment wird in 1 ml TER gelöst, 1 h bei 37°C verdaut, wie oben mit Phenol/Chloroform/IAA und Chloroform gereinigt und erneut präzipitiert. Das DNS-Sediment löst man in 1 ml TE (10 : 0,1).

CPES: 40 mM Zitronensäure
 120 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
 1,2 M Sorbitol
Vor Verwendung 20 mM EDTA, pH 7,5 und 5 mM DTT zugeben.

YLS II: 20 mM EDTA, pH 8,0
 20 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM NaCl
 1 mg/ml Proteinase K
 0,5% SDS

Phenol/Chloroform/IAA: 25:24:1 Gemisch

TER: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA
 20 mg/ml RNase A

4.1.1.5 HERSTELLUNG VON DNS-BLÖCKCHEN FÜR DIE PFGE

Zur Restriktionscharakterisierung von großen DNS-Fragmenten mittels PFGE ist es wichtig, intakte, nicht durch Scherkräfte gebrochene DNS zur Verfügung zu haben. Daher ist es nötig, die DNS in Agaroseblöckchen zu immobilisieren.

Der YAC-tragende Klon wird zunächst auf einer AHC-Agarplatte unter Selektionsbedingungen (20 mg Adeninhemisulfat pro Liter) ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Eine rosa Kolonie wird in 200 ml AHC-Amplifikations-Medium (100 mg Adeninhemisulfat pro Liter) 2 Tage bei 30°C angeschüttelt. Die Ernte der Hefezellen erfolgt durch zehnminütige Zentrifugation bei 3.000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus). Das Sediment wird einmal mit bidest. Wasser und

einmal mit CPES gewaschen. Anschließend bestimmt man die Zellzahl (Kap. 4.5.1), stellt diese mit CPES auf eine Konzentration von 10^9 Zellen pro ml ein und hält die Suspension während der folgenden Arbeitsschritte auf Eis.

Nun bereitet man die Blöckchenformen vor: man wäscht sie gründlich mit Wasser und Ethanol, trocknet sie, klebt die Unterseite mit Tesafilm ab und plaziert sie in eine große Petrischale auf Eis. Anschließend setzt man 1%ige LMP-Agarose in CPES an, kocht sie auf und äquilibriert sie bei 42°C . Die benötigte Menge an Zymolyase (10 mg pro ml Hefezell-Agarose-Gemisch) und löst man ebenfalls in CPES. Die Hefesuspension erwärmt man auf 42°C , resuspendiert gut und gibt das gleiche Volumen LMP-Agarose zu. Nach Hinzufügen der benötigten Menge Zymolyase-CPES-Lösung mischt man gut und verteilt die Hefezell-LMP-Agarose-Zymolyase Mischung mit der Pipette in die vorbereiteten Blöckchenformen. Zum Erstarren stellt man die Formen 20-30 min in einen 4°C Kühlschrank.

Anschließend entfernt man den Tesafilm von den Blöckchenformen, klopft die Hefe-Blöckchen vorsichtig aus der Form auf saubere Frischhaltefolie und transferiert sie in 50 ml Röhrchen, die mit 0,5 ml CPES pro Blöckchen gefüllt sind. Während der folgenden 2-3 stündigen Inkubation (alle 20 min vorsichtig Mischen) bei 37°C schließt die Zymolyase die Hefezellwand auf. Zur Entfernung der Proteine werden die Blöckchen dann bei 50°C mit detergenzhaltigem YLS I behandelt, wie oben mit 0,5 ml Lösung pro Blöckchen. Dabei wird zunächst eine Stunde inkubiert, die Lösung dann gewechselt und weiter über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Blöckchen 10-20 mal jeweils eine halbe Stunde unter vorsichtigem Mischen mit TE (10 : 10) gewaschen. Sie werden in TE (10 : 10) bei 4°C aufbewahrt.

- CPES: 40 mM Zitronensäure
 120 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 1,2 M Sorbitol
 mit Wasser auffüllen, pH auf 6,0 einstellen und autoklavieren. Vor Verwendung erfolgt die Zugabe von 20 mM EDTA, pH 7,5 und 5 mM DTT.
- YLS I: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 100 mM EDTA
 1% Lithiumdodecylsulfat
 Die Lösung wird sterilfiltriert.
- TE (10:10): 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
 10 mM EDTA

4.1.1.6 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS AUS ZELLEN UND GEWEBE

Geerntete eukaryontische Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, 5 min bei 1.000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert und das Zellsediment in adäquatem Volumen (3 ml für 5×10^7 Zellen) Kernlysepuffer resuspendiert. Die Zugabe von SDS bis zu einer Endkonzentration von 1% bewirkt die Lyse der Zellkerne und die Freisetzung der DNS. Anschließend erfolgt eine mindestens zweistündige Inkubation bei 37°C mit Proteinase K, die in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben wird. Danach werden die Proteine mit NaCl (1,5 M Endkonzentration) gefällt, die Lösung gut auf dem Vortexschüttler gemischt, wobei die DNS geschert wird, und dann 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min, 2.500 rpm) werden die Proteinfragmente sedimentiert. Der DNS-haltige klare Überstand wird abpipettiert und mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt. Die fadenförmig fallende DNS wird mit einem Glashäkchen gefischt und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen löst man die DNA in 100-300 µl bidest. Wasser oder TE (10 : 0,1).

Wenn man DNS aus Gewebe isolieren will, muß man dieses vorher homogenisieren. Dies geschieht in Kernlysepuffer entweder im Dounce-Homogenisator oder mit Hilfe des Ultraturax. Zu den suspendierten Zellen gibt man dann wie oben beschrieben SDS zu und nach kurzem Mischen Proteinase K. Die Inkubation mit Proteinase K erfolgt wie oben beschrieben. Anschließend mischt man die Lösung gut auf dem Vortexschüttler, so daß die DNS geschert wird. Zur Entfernung der Proteine erfolgt nun eine Phenolextraktion mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/IAA: nach Zugabe mischt man gründlich auf dem Vortexschüttler, zentrifugiert zur Phasentrennung 5 min bei 1.500 rpm und nimmt den wäßrigen Überstand ohne Verunreinigungen ab. Der Überstand wird dann einmal mit Chloroform extrahiert und danach mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt. Unter vorsichtigem Mischen fällt die DNS fadenförmig aus und wird wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Kernlysepuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 400 mM NaCl
 10 mM EDTA

SDS: 20%ig

Proteinase K-Lösung: 4 mg/ml

4.1.1.7 ISOLIERUNG VON DNS AUS PRÄPARATIVEN AGAROSEGELN

DNS wird aus Agarosegelen isoliert, wenn man DNS-Fragmente aus Plasmiden gewinnen oder PCR-Produkte zur späteren Subklonierung reinigen will. Die restringierte DNS bzw. die vereinigten

PCR-Ansätze werden auf einem präparativen Agarose-TBE-Gel geeigneter Prozentigkeit aufgetrennt. Unter UV-Licht schneidet man dann mit einem Skalpell die gewünschte Bande möglichst genau aus, transferiert sie in ein Eppendorfreaktionsgefäß und bestimmt das Gewicht. Vom Gewicht hängt die Menge der zuzugebenden Salzlösungen ab, in denen das Gel bei 56°C geschmolzen wird. Die DNS wird mit Silica-Milch gefällt und anschließend, nach Waschschritten, eluiert. Die Menge der isolierten DNS wird auf einem Gel abgeschätzt. Eine detailliertere Beschreibung der Methode befindet sich in den Anleitungen des Kits (Nucleo™ GX, Amersham Life Science) der für die DNS-Isolierung aus Gelen verwendet wurde.

4.1.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS, RNS UND OLIGONUKLEOTIDEN

Die Konzentration von DNS, RNS und von Oligonukleotiden kann mit dem Fotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum haben. DNS-Konzentrationen können auch durch Auftragen zusammen mit einem Standard auf einem Agarosegel abgeschätzt werden.

4.1.2.1 FOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Bevor man die zu messenden Verdünnungen ansetzt, muß sichergestellt sein, daß die Nukleinsäure vollständig gelöst ist. Dann verdünnt man in Wasser 1:250 und 1:500 und mißt die optische Dichte gegen den Leerwert. Die Konzentration berechnet man aus der Gleichung: $c = OD \times \epsilon^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}$, wobei folgende ϵ -Werte gelten:

ϵ RNA:	40 ng/ μ l
ϵ DNA:	50 ng/ μ l
ϵ Oligonukleotide:	33 ng/ μ l

Wenn sich Verunreinigungen oder RNA in der DNS-Präparation befinden, ist die Konzentrationsbestimmung mittels Fotometer nicht zuverlässig. Deshalb ist es zweckmässig die Konzentration von DNS auf einem Agarosegel zu testen.

4.1.2.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG ÜBER AGAROSEGELE

Die Konzentration von DNS kann zuverlässig auf Agarosegelen bestimmt werden. Dazu trägt man ein Aliquot der DNS auf ein Gel geeigneter Prozentigkeit (siehe Tabelle S. 55 nach Sambrock et al., 1989) und in die Nachbarspur einen Molekulargewichtsstandard auf. Hier wurde ein 1 kb-Molekulargewichtsstandard der Firma Gibco BRL verwendet. Der Standard ist so verdünnt, daß man 10 ng DNS pro Einfachbande bzw. 20 ng pro Doppelbande erhält. Die Bande der

aufgetragenen DNS-Probe wird nun nach Abschluß des Gellaufs mit einer ihrer Größe entsprechenden Standardbande verglichen und die Menge abgeschätzt.

4.1.3 RESTRIKTION VON DNS

In den folgenden Abschnitten wird das Ansetzen von Restriktionsverdau von Plasmid-DNS, BAC-DNS, genomischer DNS und PFGE-Blöckchen beschrieben.

4.1.3.1 RESTRIKTION VON PLASMID-DNS

Restriktion von Plasmid-DNS ist nötig um zu überprüfen ob das isolierte Plasmid korrekt ist, d.h. die richtigen Schnittstellen aufweist bzw. die richtige Insertionsgröße hat. Für diese Zwecke werden ca. 100 ng Plasmid DNS mit 0,1 Unit eines geeigneten Restriktionsenzym für 1 Stunde in einem Volumen von 20 μ l inkubiert. Der gesamte Ansatz wird dann auf einem 1xTBE-Agarosegel (12x14 cm) in 1xTBE-Laufpuffer mit Ethidiumbromid mit 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Will man ein DNS-Fragment aus einem Plasmid isolieren, so setzt man in den Restriktionsverdau größere Mengen DNS ein, d.h. 10-20 μ g und inkubiert 2-3 Stunden mit 10-20 Units in einem Volumen von 100-200 μ l. Das gesamte Volumen wird anschließend mit Auftragspuffer versetzt und auf einem präparativen Gel aufgetrennt. Um eine gute Auftrennung zu erreichen ist es wichtig das Gel (12x14 cm) nicht bei zu hoher Voltzahl (ca. 50 V) laufen zu lassen und einer geeigneten Prozentigkeit zu wählen (siehe Tabelle S. 55 nach Sambrook et al., 1989).

10x TBE: 0,89 M Tris
 0,89 M Borsäure
 0,02 M EDTA
 pH auf 8,0 einstellen.

6x Auftragspuffer: 20% Ficoll
 0,15% Bromphenolblau
 0,15% Xylencyanol in TE pH 8,0 lösen.

Ethidiumbromid-Stocklösung: 10 mg/ml

Laufpuffer: 1x TBE mit 15 μ l EtBr-Stocklösung pro Liter versetzen.

4.1.3.2 RESTRIKTION VON BAC-DNS

BAC-DNS wird mit verschiedenen Restriktionsenzymen zur Erstellung einer Restriktionskarte verdaut. 400-500 ng der DNS werden in einem Volumen von 30 μ l 1x Restriktionspuffer 2-3

Stunden mit 5 Units Restriktionsenzym bei geeigneter Temperatur inkubiert. Da BAC mit 100 bis 150 kb sehr große Plasmide sind, sollte man vorsichtig pipettieren und nicht auf dem Vortexschüttler mischen. Der gesamte Ansatz wird dann auf ein 1,2%iges PF-Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgt unter den in Kap. 4.1.4.2 angegebenen Bedingungen in 0,25x TBE ohne Ethidiumbromid.

4.1.3.3 RESTRIKTION GENOMISCHER DNS

Für die Restriktion genomischer DNS werden 10 μg der zu testenden DNS eingesetzt. Der Verdau erfolgt in einmal Restriktionspuffer und einem Volumen von 40-50 μl , so daß die DNS-Konzentration ca. 200-300 μg pro μl beträgt. Es werden 10 Units Restriktionsenzym eingesetzt und 2-3 Stunden bei geeigneter Temperatur inkubiert. Nach 1,5 Stunden entnimmt man ein Aliquot des Verdaus (ca. ein Zehntel) und testet es auf einem 0,7%igen Agarose-TBE-Gel auf Vollständigkeit des Verdaus. Wenn der Verdau nicht vollständig sein sollte, kann man das Volumen des Restriktionsansatzes erhöhen, nochmals 5 Units Restriktionsenzym zugeben und weiter inkubieren. Der gesamte Ansatz wird dann mit 6x Auftragspuffer versetzt und auf ein 0,7%iges TPE Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 40 V über Nacht in 1x TPE mit 15 μl EtBr-Stocklösung pro Liter Laufpuffer.

6x Auftragspuffer: 20% Ficoll
 0,15% Bromphenolblau
 0,15% Xylencyanol
 In TE pH 8,0 lösen.

10x TPE: 360 mM Tris
 300 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 10 mM EDTA

4.1.3.4 RESTRIKTION VON DNS-BLÖCKCHEN FÜR DIE PFGE

Die in TE (10 : 10) bei 4°C gelagerten DNS-Blöckchen werden dreimal 20 min mit TE geringerer EDTA-Menge (10 : 1) in einem 10 ml Röhrchen gewaschen, mit einem sterilen Skalpell halbiert und in Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Anschließend inkubiert man die halben Blöckchen eine Stunde in 200 μl des entsprechenden Restriktionspuffers um optimale Bedingungen für den folgenden Restriktionsverdau herzustellen. Der Restriktionsverdau erfolgt ebenfalls in einem Volumen von 200 μl . Soll der Verdau vollständig sein, setzt man pro halbes Blöckchen 10-15 Units Restriktionsenzym ein und inkubiert bei der geeigneten Temperatur für mindestens 2

Stunden. Unvollständige Kartierungsverdau wurden nach folgendem Schema angesetzt und pipettiert:

Nummer	1	2	3	4	5
1x RE-Puffer	300 μ l	160 μ l	180 μ l	190 μ l	198 μ l
Enzym	15 Units	40 μ l (2 U) aus 1	20 μ l (1 U) aus 1	10 μ l (0,5 U) aus 1	2 μ l (0,1 U) aus 1

Kartierungsverdau wurden mit den Enzymen BssH II und Mlu I durchgeführt. Die Inkubation mit BssH II erfolgte für 1 Stunde bei 50°C, mit Mlu I wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Verdau wird durch Zugabe von 0,5 M EDTA, pH 8,0, auf Eis gestoppt. Nach 15 min pipettiert man vorsichtig die Lösung von den Blöckchen ab und äquilibriert dreimal jeweils 20 min (oder über Nacht) in Laufpuffer. Währenddessen bereitet man das PF-Gel vor, füllt den Lauftank mit Laufpuffer (0,5x TBE ohne Ethidiumbromid) und kühlt auf 8°C. Die äquilibrierten Blöckchen werden nun nacheinander in eine saubere Petrischale transferiert, mit einem ebenfalls sterilen Skalpell zurechtgeschnitten, so daß sie in die Geltaschen passen und in diese eingepaßt. Dabei ist darauf zu achten, daß man die Oberfläche der Blöckchen nicht verletzt und daß sie gerade und ohne Luftblasen in den Taschen stecken, sonst leiden Qualität der Auftrennung und Bandenschärfe. In eine Tasche wird ein kleiner Streifen Molekulargewichtsstandard (Lambda-Concatamere, Boehringer Mannheim), der ebenfalls in Blöckchenform vorliegt, aufgetragen. Sind alle Blöckchen im Gel, werden die Taschen mit Agarose versiegelt, damit die Blöckchen nicht aus den Taschen schwimmen können. Sobald die Agarose fest ist, stellt man das Geltaflet in den Lauftank und läßt es 1-2 Stunden äquilibrieren bevor man den Lauf (4.1.4.2) startet.

1x Restriktionspuffer BssH II: 1x Restriktionspuffer A (Boehringer Mannheim, Mannheim)
0,1% Gelatine
1 mM Spermidin

1x Restriktionspuffer Mlu I: 1x Restriktionspuffer H (Boehringer Mannheim, Mannheim)
0,1% Gelatine
1 mM Spermidin
0,1 mM DTT

5x TBE-Laufpuffer: 180 mM Tris
450 mM Borsäure
10 mM EDTA
pH auf 8,5 einstellen und autoklavieren.

PF-Gel: 120 ml 1,2% Agarose (MP von Boehringer Mannheim) in 0,5x TBE-Laufpuffer werden gekocht bis die gesamte Agarose aufgelöst ist. Das verdampfte Volumen wird mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, die Gellösung auf 60°C abgekühlt und auf das gesäuberte Geltablett gegossen. Im Gel befindliche Luftblasen und Luftblasen in den Verankerungsfüßchen werden mit einer Pipette entfernt und der Kamm gerade eingesteckt. Das Gel soll 45 min polymerisieren, bevor man den Kamm zieht und die Blöckchen einpassen kann.

Versiegelungsagarose: 0,5% Agarose in 0,5x TBE Laufpuffer

4.1.4 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA UND KAPILLARTRANSFER

4.1.4.1 TBE- UND TPE-AGAROSEGELE

Will man PCR-Produkte oder Plasmide testen, verwendet man Agarosegele geeigneter Prozentigkeit (siehe Tabelle unten). Die Gele stellt man mit 1x Laufpuffer (1x TBE bzw. 1x TPE mit 15 µl EtBr-Stocklösung versetzt) her.

Länge der DNS (in bp)	100-300	300-500	500-1000	über 1000
Prozentigkeit des Gels	2%	1,5%	1%	0,7%

Zur Auftrennung von restringierter genomischer DNS verwendet man 0,7%ige Agarosegele, die mit 1x TPE-Puffer angesetzt werden. Derselbe Puffer wird als Laufpuffer eingesetzt. TPE hat gegenüber von TBE den Vorteil, daß er mehr Salz enthält und so die Auftrennung von Proben, die mit verschiedenen Restriktionspuffern versetzt sind, verbessert.

Sowohl TBE- als auch TPE-Puffer ist Ethidiumbromid zugesetzt, das während der elektrophoretischen Auftrennung der DNS in die Doppelstränge interkaliert. Durch Interkalation von Ethidiumbromid kann DNS unter UV-Licht (hier 312 nm) sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation fotografiert werden. Das Gel kann nun zum Kapillartransfer vorbereitet werden (Southern, 1975). Dabei ist darauf zu achten, daß man die Gele nur mit Handschuhen berührt. Zur gleichmässigen Verteilung der Lösungen führt man die Inkubationen auf einem Schüttler durch: die Gele werden zuerst 10 min mit 0,25 M HCl behandelt. Dies bewirkt, daß die DNS alle ca. 3000 bp depuriniert und infolgedessen der Doppelstrang gebrochen wird. Große Fragmente, wie sie z.B. bei Restriktion von genomischer DNS entstehen, werden also kleiner und können besser aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Wenn DNS transferiert wird, die kleiner als 5000 bp ist (PCR-Produkte), entfällt die HCl-Behandlung. Nach 10 min gießt man die HCl-Lösung ab, wäscht das Gel mit Leitungswasser, gibt Denaturierungs-

lösung zu und inkubiert 45 min. Währenddessen baut man den Southernblot auf. Man füllt ein Plastischale mit Transferlösung, legt ein Gitter auf, auf dem sich ein Filterpapierstreifen (GB 002) mit der Breite des Gels, dessen Enden in die Transferlösung tauchen, befindet. Diese »Papierbrücke« sorgt für den Flüssigkeitsstrom, der den Transfer der DNS aus dem Gel auf die Nylonmembran bewirkt. Wenn sich die Brücke mit Transferlösung vollgesaugt hat, glättet man sie mit Hilfe einer Glaspipette und entfernt vorhandene Luftblasen, die den Transfer hemmen. Nun legt man vorsichtig, ohne Luftblasen, das vorbereitete Gel auf und auf dieses die Transfermembran (im Falle genomischer und YAC-DNS Hybond N+, bei PCR-, Plasmid- und BAC-Blots Hybond N). Eventuell vorhandene Luftblasen entfernt man. Auf die Membran kommt ein mit Transferlösung befeuchtetes Filterpapier (GB 002), anschließend 6 dünne (GB 002) und 6 dicke (GB 003) trockene Filterpapiere und ca. 5 cm Blottingpapier. Der Aufbau wird mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Der Transfer genomischer DNS erfolgt über Nacht, PCR-Produkte werden eine Stunde geblottet. Nach Ablauf der Transferzeit, baut man den Blot auseinander, wobei man die Membran auf dem Gel liegen läßt und die Geltaschen auf der Transfermembran markiert. Danach nimmt man die Membran ab, wäscht sie 5 min in 2 x SSC, läßt sie zwischen Filterpapier lufttrocknen und fixiert danach die DNS durch backen im Trockenschrank (2 Stunden, 80°C). Die Membran ist jetzt zur Hybridisierung bereit.

Depurinierungslösung: 0,25 M HCl

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Transferlösung: 0,4 M NaOH

4.1.4.2 PF-GELE

Zur Auftrennung von DNS, die größer als 50 kb ist, wurden PF-Gele gefahren, d.h. sowohl YAC- als auch BAC-DNS wurde mit PFGE analysiert.

Bisher gibt es nur Theorien über die elektrophoretische Wanderung von DNS unter PF-Bedingungen. Eine dieser Theorien, die »Reptationstheorie« (Slater et al., 1987), nimmt an, daß sich die DNS während einer Pulsdauer (Ost-West) in Richtung Anode (West) streckt und eine kurze Strecke durch das Gel in Richtung Anode wandert. Werden nun die anderen Pole (Nord-Süd) aktiv, zieht sich der DNS-Faden in der Umschaltzeit zusammen und beginnt während dieser Pulszeit auf die andere Anode (Süd) zuzuwandern, und so fort. Die Zick-Zack-Wanderung der DNS immer in Richtung der gerade aktiven Pole, resultiert in einer linearen Netto-Bewegung der DNS. Die Auftrennung der DNS-Fragmente im PF-Gel erfolgt linear nach ihrer Größe.

YAC-Gele: YAC/Hefe-DNS wurde auf 1,2%igen Agarosegelen in 0,5x TBE-Laufpuffer bei 8°C und 200 V (180-250 mA) aufgetrennt. Die Laufzeiten bewegen sich zwischen 18 und 24 Stunden, wobei die Pulszeiten je nach aufzutrennender Fragmentlänge zwischen 40-60 sec liegen.

Nach Abschluß des Gellaufs färbt man das Gel für eine Stunde mit Ethidiumbromid, fotografiert es und bereitet es für den Kapillartransfer vor. Dieser erfolgt wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Da jedoch die aufgetrennten DNS-Fragmente sehr groß sind – bis zu 1 Mb – muß man die Gele länger mit HCl behandeln. Die Depurinierung erfolgt 2 mal 10 min mit 0,25 M HCl. Die DNS wird auf Hybond N+ Nylonmembran geblottet.

BAC-Gele: BAC-DNS wurde zur Kartierung auf 1,2%igen mit 0,25xTBE angesetzten PF-Gelen, aufgetrennt. Laufpuffer ist ebenfalls 0,25x TBE.

Der Gellauf dauert 4 Stunden bei 450 V (250 mA) und 8°C-Kühlung und beinhaltet 3 verschiedene Pulszeiten:

1. 1 h Pulszeit (N/S-O/W) 0,4 sec
2. 1 h Pulszeit (N/S-O/W) 0,6 sec
3. 2 h Pulszeit (N/S-O/W) 0,9 sec.

Nach Abschluß des Laufs wird das Gel vom Gelträger abgenommen, 1 Stunde mit Ethidiumbromid-Färbelösung angefärbt, unter UV-Licht fotografiert und zum Blotten vorbereitet. Die Prozedur entspricht der des normalen Southernblots, der im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde. Die DNS wird auf Hybond N Nylonmembran transferiert.

5x TBE-Laufpuffer: 180 mM Tris
450 mM Borsäure
10 mM EDTA
pH auf 8,5 einstellen und autoklavieren.

Färbelösung: 20 µl der EtBr-Stocklösung (10 mg/ml) auf 300 ml Laufpuffer

4.1.5 NICHTRADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG

Die nichtradioaktive Hybridisierung basiert auf dem von Boehringer Mannheim entwickelten Digoxigenin (DIG)-System und wurde von Engler-Blum et al. (1993) in Hinblick auf Sensitivität und Hintergrundprobleme der Detektion verbessert. DIG-markiertes dUTP wird in die DNS-Sonde eingebaut und mit Hilfe einer Immundetektion über mit alkalische Phosphatase (AP) gekoppelte, gegen DIGgerichtete F_{ab} -Fragmente und anschließender Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen. Um Hintergrundsignale zu vermeiden, sollen alle Lösungen mit sterilem, deionisiertem Wasser angesetzt werden. Die Blotmembran darf nie mit bloßen Händen berührt oder während der Immundetektion trocken werden. Außerdem ist darauf zu achten, daß alle verwendeten Gefäße sauber sind.

4.1.5.1 HERSTELLUNG VON DIG-MARKIERTEN DNS-SONDEN

DNS-Sonden für die nichtradioaktive Hybridisierung werden entweder über PCR oder mit Hilfe der »random priming Methode« mit DIG markiert.

Die PCR-Markierung von DNS-Sonden ist möglich, wenn das zu markierende Fragment ca. 1200 bp oder kleiner ist. Der Reaktionsansatz entspricht dem einer Standard-PCR-Reaktion. Es wird jedoch ein spezieller Nukleotidmix verwendet, in dem sich DIG-markiertes dUTP befindet, das anstelle von dTTP in die neu synthetisierte DNS eingebaut wird. Der Erfolg der Markierungsreaktion wird auf einem Agarosegel getestet und die Menge der PCR-Sonde wie in Kap. 4.1.2.2 beschrieben abgeschätzt.

Will man größere DNS Fragmente mit DIG markieren, verwendet man die »random priming Methode«. Zur hitzedenaturierten DNS (100 ng-2 µg pro Markierungsansatz) werden Hexanukleotid-Mix (Boehringer Mannheim), DIG-dNTP-Mix und 2 Units Klenow-Enzym gegeben. Die Hexanukleotide binden an die DNS und werden von der Klenow-Polymerase unter Einbau der dNTPs und des markierten DIG-dUTPs in 5'-3'-Richtung verlängert. Die neusynthetisierte DNS ist folglich DIG-markiert. Die Reaktion wird nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt, es wird jedoch auf Fällung der Sonde, nach Abschluß der Markierung, verzichtet. Die Markierungseffizienz wird ebenfalls nach Angaben des Herstellers bestimmt.

DIG-dNTP-Mix: 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1,3 mM dTTP
 0,7 mM DIG-dUTP

4.1.5.2 HERSTELLUNG VON DIG-MARKIERTEN DNS-SONDEN FÜR DIE KARTIERUNG VON YAC

Zur Kartierung der YAC mittels unvollständigem Restriktionsverdau und nachfolgender Hybridisierung des Southernblots werden Sonden benötigt, die die Enden der YAC erkennen. Da der YAC-Vektor pYAC4.1, in den die DNS-Fragmente kloniert sind, sequenzidentische Bereiche zum Vektor pBR322 hat, kann dieser zur Herstellung der Sonden verwendet werden. pBR322 wird wie unter 4.1.1.2 beschrieben isoliert. 10 µg Plasmid-DNS werden in einem Doppelrestriktionsansatz mit je 10 Units Bam HI und Pvu II 3 h bei 37°C in 1x Puffer B verdaut und auf einem präparativen 0,7%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die Enzyme schneiden das Plasmid in zwei 2,6 und 1,6 kb große Teile. Unter UV-Licht werden die DNS-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS wie unter 4.1.1.7 beschrieben aus dem Gel isoliert. Die Menge der gereinigten DNS wird auf einem Gel abgeschätzt. Je 150 ng DNS werden nun mit Klenow-Enzym nach der »random priming Methode« (siehe 4.1.5.1) mit DIG markiert. Nach Bestimmung der Markierungseffizienz sind die Sonden zur Hybridisierung einsetzbar.

4.1.5.3 HYBRIDISIERUNG VON SOUTHERN- UND NORTHERNBLOTS

Die 2 Stunden bei 80 °C gebackenen Southern- bzw. Northernblots werden in Plastikfolie eingeschweißt, mit 2x SSC befeuchtet und für eine Stunde bei 68°C im Schüttelwasserbad mit Prähybridisierungslösung äquilibriert. Unterdessen denaturiert man die DIG-markierte Sonde in einem Volumen von ca. 50 µl bidest. Wasser. Sie wird 10 min im Wasserbad aufgekocht, 5 min auf Eis inkubiert und dann zu einer abgemessenen Menge 68°C-temperierter Prähybridisierungslösung pipettiert. Für Southernblots setzt man 2,5 ng, für Northernblots 10 ng Sonde pro ml Hybridisierungslösung ein.

Nach einer Stunde entfernt man die Prähybridisierungslösung, gibt die Hybridisierungslösung zum Blot und inkubiert über Nacht bei 68°C im Schüttelwasserbad.

Prähybridisierungslösung: 0,25 M Na₂HPO₄, pH 7,2
1 mM EDTA
20% SDS
0,5% Blocking Reagenz
Vor Verwendung 30 min auf 68°C temperieren.

Hybridisierungslösung: wie Prähybridisierungslösung; Es werden 2,5 ng/ml DIG-markierte denaturierte Sonde für Southernblot bzw. 10 ng/ml DIG-markierte denaturierte Sonde für Northernblot zugegeben.

4.1.5.4 IMMUNDETEKTION

Nach der Hybridisierung über Nacht wird unspezifisch gebundene Sonde durch stringentes Waschen (dreimal mit 65°C-Waschpuffer für jeweils 20 min) bei 65°C entfernt. Alle folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Zunächst wäscht man die Blots 5 min mit Waschpuffer I (WP I) und inkubiert danach zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran eine Stunde mit Blockierungspuffer. Nun folgt die Zugabe des gegen DIG-gerichteten, AP-gekoppelten Antikörperkonjugats, das 1:20.000 mit WP I verdünnt wird und 30 min auf dem Blot bleibt. Überschüssiges Konjugat wird durch viermaliges Waschen mit WP I (jeweils 10 min) entfernt. Um den pH-Wert und die Salzkonzentration für die alkalische Phosphatase einzustellen, äquilibriert man die Blots 5 min in Substratpuffer bevor man schließlich das Substrat zugibt. Das Substrat CDP* wird 1:100 in Substratpuffer verdünnt, auf der Membran verteilt und bleibt dort 5 min. Dabei sind 2 ml Lösung für einen Filter von 10x20 cm ausreichend. Die Membran wird nun in Plastikfolie eingeschweißt, überschüssige Substratlösung entfernt und mit der DNS bzw. RNS-Seite zum Röntgenfilm weisend exponiert. Je nach Sonde und Ziel-DNS bzw. -RNS liegen die

Expositionszeiten zwischen 15 min (PCR, Plasmid, BAC als Ziel-DNS) und 2-3 Stunden (YAC, genomische DNS und RNS) oder länger.

65°C-Waschpuffer:	20 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM EDTA 1% SDS
Waschpuffer I (WP I):	0,1 M Maleinsäure 3 M NaCl 0,3% Tween 20
Blockierungspuffer:	0,5% Blocking Reagenz in WP I
Konjugatpuffer:	anti DIG-F _{ab} -Fragment 1:20.000 in Blockierungspuffer
Substratpuffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Substrat:	CDP* 1:100 in Substratpuffer

4.1.5.5 ENTFERNEN DIG-MARKIERTER DNS-SONDEN VON SOUTHERNBLOTS (STRIPPING)

Will man denselben DNS-Blot nacheinander mit verschiedenen DIG-markierten DNS-Sonden hybridisieren, muß man die zuvor gebundene Sonde entfernen. Es ist jedoch schwierig, sehr starke Signale vollständig zu entfernen. Sie bleiben erhalten und sind nach der nächsten Hybridisierung schwächer zu sehen.

Da das eingebaute DIG alkalilabil ist, erfolgt die Dehybridisierung mit 0,4 M NaOH für 45 min bei 45°C. Anschließend inkubiert man den Blot mit Dehybridisierungslösung für 15 min bei Raumtemperatur und wäscht ihn danach 5 min mit 2x SSC. Der Blot kann nun prähybridisiert und erneut hybridisiert werden. Das Protokoll entspricht dem des Herstellers der Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Life Technologies).

Dehybridisierungslösung:	0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 0,1x SSC 0,1% SDS
--------------------------	--

4.1.6 PCR-AMPLIFIKATION VON DNA

PCR-Amplifikationen wurden nach der von Saiki et al. (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide mit den dazugehörigen MgCl₂-Konzentrationen

und Anlagerungstemperaturen sind in Kap. 3.6 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 500 μl Reaktionsgefäßen in einem Volumen von 20 μl durchgeführt. Es wurden 2 mM Nukleotidmix, 50 ng pro Oligonukleotid und 0,1 U Taq-Polymerase pro 20 μl -Reaktionsansatz verwendet. Die eingesetzte MgCl_2 -Konzentration hängt von den verwendeten Oligonukleotiden ab.

Die Menge der zu amplifizierenden DNS richtet sich nach ihrer Herkunft: so werden pro 20 μl -Reaktionsansatz 200 μg genomische DNS, 20 ng YAC-enthaltende genomische Hefe-DNA, 5 ng BAC-DNS und 1-0,1 ng Plasmid-DNS eingesetzt.

10x dNTP: jeweils 2 mM von dATP, dTTP, dCTP und dGTP in sterilem bidest. Wasser.

MgCl_2 : 25 mM Stocklösung

10x PCR-Puffer (Perkin Elmer): 100 mM Tris/HCl, pH 8,3
500 mM KCl

4.1.7 PCR-AMPLIFIKATION VON GROßEN FRAGMENTEN (LONG RANGE PCR)

Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten größer als 3 kb wurde ein modifiziertes PCR-Protokoll verwendet. Die Reaktionen wurden nach der, der Taq-Polymerase (AccuTaq, Sigma) beiliegenden Anleitung angesetzt. Die folgende Tabelle enthält die eingesetzten Reagenzienkonzentrationen pro 50 μl PCR-Ansatz.

	10x PCR-Puffer	dNTPs 10 mM	Oligonukleotide	DMSO	DNS	AccuTaq
Endkonz.	1 x	je 500 μM	je 400 nM	2%	0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,05 U/ μl

Die PCR-Bedingungen unterscheiden sich von den sonst durchgeführten PCR-Reaktionen. Das Zyklen-Programm für die PCR-Maschine Gene Amp 9600 (Perkin Elmer) lautet:

30 Zyklen mit:

2 min	94°C	Anfangsdenaturierung
20 sec	98°C	Denaturierung
30 sec	X°C	Anlagerung (Temperatur hängt vom Oligonukleotid ab)
2 min	68°C	pro kb Amplifikat

4.1.8 SUBKLONIEREN VON PCR-PRODUKTEN

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde der »TA Cloning Kit« von Invitrogen verwendet. Ein Aliquot des PCR-Amplifikates wird auf korrekte Größe und Menge auf einem Agarosegel

getestet und anschließend nach Angaben des Herstellers in den Ligationsansatz eingesetzt. Die Ligation in den TA-Vektor pCR2.1 erfolgt über Nacht bei 14°C.

Ist eine Reinigung des PCR-Amplifikates vonnöten, z.B. wenn trotz Austesten der PCR-Bedingungen mehr als ein Amplifikat auftritt, so erfolgt dies mit Hilfe eines Kits (Nucleon™ GX, Amersham) nach Angaben des Herstellers. Die Ausbeute der Reinigung wird auf einem Agarosegel geprüft und das gereinigte PCR-Produkt dann in den Ligationsansatz eingesetzt.

Transformation der Bakterien und Testen der Klone erfolgen nach Angaben des Herstellers. Zur PCR-Testung der weißen, transformierten Kolonien, wird ca. 0,5 µl Bakterienkolonie-Material mit einer gelben Spitze entnommen und in je 100 µl bidest. Wasser resuspendiert. Davon wird je 1 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Lyse der Bakterienzellen und Freisetzung ihrer DNS erfolgt die Anfangsdenaturierung 10 min bei 94°C. Ein Aliquot des PCR-Amplifikates wird auf einem Gel getestet. Von positiven Klonen, die ein PCR-Amplifikat der erwarteten Größe zeigen, werden 5 ml-Übernachtskulturen (LB-Medium + Kanamycin) angeschüttelt und wie unter 4.1.1.1 beschrieben Plasmid-DNS isoliert. 5 µl der Plasmidpräparation werden mit einem Enzym restringiert, welches die Insertion aus dem Plasmid ausschneidet: im Falle des hier verwendeten Vektors pCR2.1 sind dies EcoR I bzw. BstX I.

LB-Medium: 10 g Pepton 140 (Life Technologies)
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
In 1 l deionisiertem Wasser lösen, pH auf 7,5 einstellen und autoklavieren.
Vor Verwendung 50 µg/ml Kanamycin zugeben.

LB-Platten: 1,5% Bacto-Agar in LB-Medium autoklavieren.
Vor dem Plattengießen, in das auf 45°C abgekühlte Medium, 50 µg/ml Kanamycin zugeben.

Kanamycin: 50 mg/ml in bidest. Wasser

4.1.9 SEQUENZIERUNG

Zur Sequenzierung standen zwei Gerätetypen zur Verfügung: 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems) und ALFexpress (Pharmacia). Die Sequenzreaktionen wurden nach Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Das ABI-Sequenziergerät wurde freundlicherweise von Eve Holtorf bedient.

4.1.9.1 REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN ZUR DIREKTEN SEQUENZIERUNG

PCR-Produkte werden zur Entfernung von Oligonukleotiden, Salz- und Enzymresten der PCR-Reaktion über eine Molekulargewichtsausschlußsäule nach Anleitung des Herstellers gereinigt (HighPure™ PCR Product Purification Kit, Boehringer Mannheim). Ein Aliquot des gereinigten Produkts wird zur Mengenabschätzung auf ein Agarosegel aufgetragen. In die Sequenzreaktion werden 20-50 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt.

4.1.9.2 SEQUENZIERUNG VON SUBKLONIERTEN PCR-PRODUKTEN MIT ABI

Alle subklonierten PCR-Produkte liegen im pCR2.1-Vektor (Invitrogen) vor. Da zur Sequenzierung sehr saubere DNS benötigt wird, werden Plasmide mit Hilfe der Säulchen von Machery und Nagel isoliert (Kap. 4.1.1.1). Die DNS-Konzentration wird fotometrisch bestimmt. Das weitere Vorgehen richtet sich nun nach der verwendeten Sequenziermethode. Die meisten Sequenzreaktionen wurden auf dem Gerät von ABI mit fluoreszenzmarkierten Kettenabbruch-Nukleotiden (Prism™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit) durchgeführt. Als Template für die Sequenzierreaktion werden 200-400 ng Plasmid eingesetzt. Die Sequenzreaktion wird wie eine PCR-Reaktion auf Eis angesetzt: die Template-DNS füllt man mit bidest. Wasser auf 15 μ l auf, dann gibt man 1 μ l (ca. 50 ng) Oligonukleotid, 4 μ l des Terminatorreagenz zu, mischt mit der Pipette und führt die Cycle-Sequencing Reaktion durch. Verwendet man Oligonukleotide, deren $MgCl_2$ -Bedarf höher ist als 1,5 mM, muß man dem Sequenzieransatz $MgCl_2$ zugeben.

Das Cycle-Sequencing-PCR-Programm lautet wie folgt (für Perkin Elmer GeneAmp 9600):

Anfangsdenaturierung: 96°C, 5 min

25 Zyklen: 96°C, 15 sec
50°C, 15 sec (T_A)
60°C, 4 min

Diese Bedingungen gelten für M13-Oligonukleotide, sind jedoch für die meisten anderen ebenso geeignet. Sollte die Anlagerungstemperatur (T_A) der verwendeten Oligonukleotide erheblich abweichen, dann paßt man den T_A -Schritt im Cycle-Sequencing Programm entsprechend an. Nach Abschluß des Programms reinigt man den Sequenzieransatz nach Vorgaben des Herstellers. Alle weiteren Schritte wurden von Eve Holtdorf durchgeführt.

4.1.9.3 SEQUENZIERUNG MIT ALFEXPRESS

Einige Sequenzierreaktionen subklonierter PCR-Produkte wurden auf dem Gerät AlfExpress von Pharmacia durchgeführt. Im Gegensatz zum ABI-Sequenzierer wurden hier fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (M13 revers und M13 -20) und Abbruchnukleotide eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wird ebenfalls im »cycle sequencing« Verfahren durchgeführt. Für jeden zu sequenzierenden Klon setzt man an: 1 µg Plasmid DNS wird mit 2 µl des markierten Primers versetzt und mit bidest. Wasser auf 22 µl Volumen gebracht. Den Mix teilt man dann auf vier dünnwandige 500 µl PCR-Reaktionsgefäße auf und gibt die Stop-Nukleotide zu: ins erste Gefäß 2 µl A-Stopmix, ins zweite 2 µl C-Stopmix, ins dritte G- und ins vierte T-Stopmix. Die Cycle-Sequencing-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei sich die Anlagerungstemperatur nach dem verwendeten Oligonukleotid richtet (Thermo sequenase fluorescence labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-GTP, Amersham).

Unterdessen bereitet man das Sequenziergel nach Angaben des Herstellers vor und lässt es eine Stunde polymerisieren (Gellösung: Long Ranger™ gel solution, FMC BioProducts).

Die Proben werden dann mit 4-5 µl Auftragspuffer versetzt, 2 min bei 84°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

Die Sequenzauswertung und -korrektur erfolgten mit den Computerprogrammen »SEQ-Ed« (Applied Biosystems ABI). Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen Genworks (IntelliGenetics, Oxford Molecular Group) und MacVektor 6.0 (Oxford Molecular Group) erstellt.

4.2 ISOLIERUNG VON YAC- UND BAC-KLONEN AUS DEN BIBLIOTHEKEN VON RESEARCH GENETICS

Zur Charakterisierung der genomischen Organisation der Faktor H-Genfamilie wurden YAC- und BAC-Klone isoliert. Dazu wurden DNS-Pools der Firma Research Genetics erworben: die humane Mega-YAC-DNS Bibliothek und die humane BAC-DNS Bibliothek.

4.2.1 AUFFINDEN VON YAC-KLONEN

Das Screening der DNS-Pools mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die sowohl HF1 als auch HF2 (SCR4s/3'UTAs, siehe Kap. 3.6.1) amplifizieren. Die PCR-Amplifikate wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die Signale relativ schwach waren, wurden die Gele

4.2.5 IDENTIFIKATION POSITIVER BAC-KLONE AUS 395-VERTIEFUNGSPLATTEN

Von den Platten wurden, um die Originale zu schonen, Replikate hergestellt. Mit einem 395-Zacken Überimpfungstempel wurde Bakterienmaterial in eine mit LB-Medium (+10% Glycerol, 12,5 µg/ml Chloramphenicol) gefüllte neue 395-Vertiefungsplatte überimpft. Die beimpften Platten werden 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten werden dann in Frischhaltefolie gewickelt und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Identifizierung der positiven BAC-Klone werden Koloniehybridisierungen (Sambrock et al., 1989) durchgeführt. Dazu werden die Bakterien aus den 395-Vertiefungsplatten mit dem Stempel auf LB-Agarplatten (+ 12,5 µg/ml Chloramphenicol) überimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C erhält man das genaue Abbild der 395-Vertiefungsplatte in Form von Bakterienkolonien. Auf die Kolonien legt man vorsichtig, ohne zu Verrutschen, Nylonmembran auf (Hybond N oder N+), läßt die Membran ca. 1 min liegen, markiert die Position und zieht sie vorsichtig ab. Die Bakterienkolonien bleiben an der Membran haften und werden nun lysiert. Dazu legt man die Membran, mit den Kolonien nach oben weisend, für 3 min auf Filterpapier (GB 003), das mit 10%igem SDS getränkt ist. Anschließend legt man die Membran 5 min auf mit Denaturierungslösung und danach 5 min auf mit Neutralisierungslösung getränktes Filterpapier (GB 003). Nach dieser Behandlung wird die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen, luftgetrocknet und 1 h bei 80°C im Trockenschrank gebacken.

Die Platten werden zum Nachwachsen der Kolonien über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C aufbewahrt.

Die DNS der 395 BAC-Klone befindet sich nun auf der Nylonmembran und kann zur Identifizierung des richtigen Klons mit einer DIG-markierten DNS-Sonde hybridisiert werden. Es wurden PCR-markierte DIG-Sonden verwendet: SCR4s/3'UT zur Detektion von HF1 und HF2 positiven BAC und HF4 SCR4s/SCR5as zur Identifizierung von HF4-BAC. Hybridisierung und nachfolgende Immundetektion wurden nach der unter 4.1.5.3 und 4.1.5.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Nach Lokalisation des positiven Klons wird dieser von der Platte auf eine frische LB-Platte zur Gewinnung von Einzelkolonien ausgestrichen. Dieser Schritt ist erforderlich, da durch die Behandlung der Kolonien eine Kontamination mit Nachbarkolonien möglich ist. 10-20 Einzelkolonien werden dann mit PCR auf das Vorhandensein des BAC untersucht. Positive Klone werden zur BAC-DNS-Gewinnung in je 100 ml BAC-LB-Medium über Nacht angeschüttelt.

BAC-LB-Medium: LB-Medium mit 10% Glycerol und 12,5 µg/ml Chloramphenicol

Chloramphenicol: 25 mg/ml in Ethanol gelöst

LB-Agar:	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium, autoklavieren und nach Abkühlen auf ca. 40°C mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) versetzen.
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH
Renaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5

4.3 ARBEITEN MIT RNS

Wie für die »DNS-Methoden« bereits erwähnt, ist es auch und besonders beim Arbeiten mit RNS wichtig, steril zu arbeiten, da RNasen ubiquitär vorhanden sind. Deshalb werden alle verwendeten Lösungen autoklaviert, bidest. Wasser mit DEPC, welches RNasen inaktiviert, behandelt und beim Arbeiten Handschuhe getragen.

4.3.1 ISOLIERUNG VON RNS

RNS wird nach der sauren Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Wenn RNS aus Gewebe isoliert werden soll, wird dieses mit Hilfe des Ultraturrax homogenisiert. Dazu wäscht man den Ultraturrax zuerst mehrmals mit 4 M NaOH und anschließend mit sterilem deionisiertem Wasser. Dann gibt man ein Stück Gewebe (ca. 5 mm³) in ein 10 ml Röhrchen gefüllt mit 0,5 ml Lösung D und homogenisiert das Gewebe auf Eis stehend.

Wenn Zellkulturzellen das Ausgangsmaterial für die RNS-Isolierung sind, suspendiert man 10⁷ Zellen mit der Pipette in Lösung D. Zu den in Lösung D lysierten Zellen, gibt man nun 50 µl 2 M Natriumacetat und mischt. Danach fügt man 500 µl wassergesättigtes Phenol hinzu, mischt und gibt zuletzt 100 µl Chloroform/IAA zu. Man mischt auf dem Vortexschüttler bis die Lösung homogen weißlich wird. Sollte dies nicht eintreten, gibt man nochmals 50 µl Chloroform/IAA zu und mischt erneut. Danach inkubiert man 15 min auf Eis. Nach der anschließenden Zentrifugation von 20 min bei 4°C und 12000 rpm in der Tischzentrifuge nimmt man den wäßrigen Überstand ab, versetzt ihn mit gleichem Volumen Isopropanol, mischt und läßt die RNS mindestens 1-2 Stunden bei -20°C präzipitieren. Danach wird sie wie oben zentrifugiert. Das Sediment wird in 300 µl Lösung D resuspendiert und die RNS ein zweites Mal mit gleichem Volumen Isopropanol wie oben beschrieben präzipitiert. Nach diesem Reinigungsschritt zentrifugiert man 10 min wie oben, wäscht das RNS-Sediment mit 70%igem Ethanol, läßt es kurz lufttrocknen und löst es in 30-50 µl DEPC-Wasser. Man bestimmt die Konzentration der isolierten RNS fotometrisch (4.1.2) und bewahrt sie bei -80°C auf.

Lösung D:	4 M Guanidinium-Thiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0 0,5% Natriumlaurylsarcosin Vor Verwendung werden 0,75% β -Mercaptoethanol zugegeben.
Natrium-Acetat:	2 M, pH 4,0
Phenol:	wassergesättigt, sauer
Chloroform/IAA:	49:1
DEPC-Wasser:	100 ml bidest. Wasser mit 100 μ l DEPC versetzten, 2 Stunden bei 37°C inkubieren und autoklavieren.

4.3.2 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNS UND KAPILLARTRANSFER

Die RNS-Proben (5-10 μ g Gesamt-RNS) werden mit 2 μ l 5x MOPS, 3,5 μ l 37,5%igem Formaldehyd und 10 μ l deionisiertem Formamid versetzt. Das Probengemisch wird 15 min bei 55°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt, mit ca. 1 μ l RNS-Auftragspuffer gemischt und auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 50 V über Tag oder bei 25 V über Nacht in 1x MOPS-Laufpuffer mit 30 μ l EtBr-Stocklösung pro Liter.

Nach Abschluß des Laufs wird das Gel fotografiert. Es wird vor dem Kapillartransfer einmal 10 min mit sterilem, deionisiertem Wasser und einmal 10 min mit 20x SSC gewaschen. Danach baut man einen Kapillarblot auf (Kap. 4.1.4.1). Der Transfer erfolgt über Nacht mit 20x SSC auf positiv geladene Nylonmembran. Am nächsten Tag baut man den Blot auseinander, markiert die Geltaschen auf der Nylonmembran, wäscht diese 5 min in 2x SSC und läßt sie zwischen Filterpapier lufttrocknen. Die Membran wird anschließend 1 Stunde bei 80°C im Trockenschrank gebacken und steht dann zur Hybridisierung (siehe Kap. 4.1.5.3 und 4.1.5.4) zur Verfügung.

5x MOPS:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH 8,0
RNA-Gel:	1,2 g Agarose mit 62,2 ml bidest. Wasser aufkochen, auf 60°C abkühlen lassen, 20 ml 5x MOPS, 17,8 ml 37%iges Formaldehyd zugeben, mischen und gießen. Kämme einsetzen und das Gel 30 min polymerisieren lassen.
Laufpuffer:	1x MOPS in sterilisiertem deionisiertem Wasser, 30 μ l EtBr Stocklösung pro Liter Laufpuffer zugeben.

deionisiertes Formamid: 100 ml Formamid werden mit 10 g Ionenaustauscher (»mixed bed resin«) für 30 min bei RT und neutralem pH inkubiert, anschließend gefiltert und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

RNS-Auftragspuffer: 50% Ficoll, 1 mM EDTA
Eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol zugeben und in DEPC-Wasser lösen.

4.3.3 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA UND RT-PCR

Für die cDNS-Synthese wurden der Expand_{TM} Reverse Transkriptase Kit (Boehringer Mannheim) und Oligo(dT)₁₅ Oligonukleotide der Firma Gibco BRL verwendet. Denaturierungs- und Reverse Transkriptions-Reaktion wurden im Thermocycler von Hybaid MWG durchgeführt.

In die Reaktion werden 1 µg RNS eingesetzt, dazu gibt man dann 100 pmol Oligo(dT)₁₅ Primer, was 1 µl Oligonukleotid mit der Konzentration von 0,5 µg/µl entspricht und füllt den Reaktionsansatz mit DEPC-Wasser auf 11 µl auf. Die RNS wird nun für 10 min bei 65°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt. Nacheinander gibt man 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl 100 mM DTT, 2 µl dNTP-Mix und 1 µl (50 Units) Expand_{TM} Reverse Transkriptase zu, mischt kurz und inkubiert 1 Stunde bei 42°C. Die Reaktion wird auf Eis gestoppt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die RT-PCR wird analog zur PCR durchgeführt. Es werden 2 µl der synthetisierten cDNS pro 20 µl Ansatz verwendet. Die PCR-Bedingungen entsprechen den Angaben in den Tabellen der Oligonukleotide. Es werden 35 Amplifikationszyklen gefahren.

4.4 ARBEITEN MIT PROTEINEN

Im Rahmen der Arbeit wurden Faktor H (FH) und die Faktor H verwandten Proteine 1 und 2 (FHRP1/2) in Serum und Liquor analysiert. Beides wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Gele werden geblottet und die Blots anschließend mit verschiedenen Antikörpern gegen FH und FHRP1 und 2 detektiert.

4.4.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Serum- und Liquorproben werden 10%ige SDS-Polyacrylamid (PAA) Gele hergestellt (Laemmli, 1970, Sambrock et al., 1989). Während das Sammelgel polymerisiert, bereitet man die Proben vor. Vom Serum werden 2 µl vom Liquor 10 µl pro Tasche aufgetragen. Die Proben werden mit gleichem Volumen 2x nicht-reduzierendem Auftragspuffer gemischt und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Währenddessen spannt man die Gele in die

Laufkammer, füllt Laufpuffer ein, zieht die Kämme und spült die Geltaschen aus. Die denaturierten Proben werden kurz abzentrifugiert und dann aufgetragen. Der Gellauf startet mit 50 V bis die Proben in die Taschen eingelaufen sind, danach erhöht man auf 75 V für die Laufstrecke im Sammelgel und schließlich 95 V bis zum Ende des Laufs.

SDS-PAA-Trenngel:	10%ig, 10 ml	
	H ₂ O	4 ml
	Acrylamid (29:1)	3,4 ml
	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS	100 µl
	10% APS	100 µl
	TEMED	4 µl
SDS-PAA-Sammelgel:	4%ig, 5 ml	
	H ₂ O	3,4 ml
	Acrylamid (29:1)	0,85 ml
	1 M Tris/HCl, pH 6,8	626 µl
	10% SDS	50 µl
	10% APS	50 µl
	TEMED	5 µl
Laufpuffer:	25 mM Tris	
	192 mM Glycin	
	0,1% SDS	
2x nicht-reduzierender Auftragspuffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 6,8	
	20% Glycerol	
	4% SDS; Bromphenolblau	

4.4.2 WESTERNBLOT

Dies SDS-PAA-Gele werden nach Abschluß des Laufs auseinandergebaut und 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Blottingschwämme, Filterpapiere (GB 002) und Nitrocellulosetransfermembranen (Protran BA85 Cellulosenitrat Membran, Schleicher und Schüll) werden ebenfalls in Transferpuffer befeuchtet. Das Gel wird dann luftblasenfrei auf ein Blottingpapier transferiert und auf einen Schwamm gelegt. Auf das Gel legt man die Nitrocellulosemembran, ein weiteres Whatmanpapier und einen Schwamm. Dieses »Sandwich« wird dann in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingapparatur eingespannt, so daß die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode wandern und an der Nitrocellulosemembran haften bleiben. Der Transfer erfolgt über Nacht unter Wasserkühlung bei 25 V/50-150 mA.

Transferpuffer: 12 mM Tris
96 mM Glycin
20% Methanol

4.4.3 IMMUNDETEKTION VON WESTERNBLOTS

Alle folgenden Inkubationen werden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Für die Behandlung der Membran gelten die gleichen Hinweise wie für Southern- und Northernblots. Die primären und sekundären Antikörper werden mit Waschpuffer verdünnt und die Inkubationen zur Ersparnis von Reagenzien in Plastikfolie durchgeführt. Angaben zur jeweiligen Antikörper-Verdünnung befinden sich in Kap 3.7.

Der Westernblot wird auseinandergebaut, die Membran markiert und 5 min in PBS gewaschen bevor sie eine Stunde zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen in Blockierungspuffer inkubiert wird. Nach kurzem Waschen (5 min) in Waschpuffer folgt eine 1 stündige Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in Blockpuffer verdünnt wird. Überschüssiger Antikörper wird durch Waschen (dreimal 5 min mit Waschpuffer) entfernt. Anschließend wird der Blot 45 min mit dem sekundären Antikörper-AP-Konjugat inkubiert. Nichtgebundenes Konjugat wird in den folgenden 3 Waschrufen, jeweils 10 min mit Waschpuffer, entfernt. Die Membran wird nun 5 min in Assaypuffer äquilibriert, der mit seinem alkalischen pH-Wert die Reaktionsbedingungen für die alkalische Phosphatase optimiert. Anschließend inkubiert man ebenfalls 5 min in N-Block, danach wieder 5 min in Assaypuffer und gibt schließlich die Substratlösung zu, die auch 5 min auf der Membran bleibt. Jetzt wird überschüssige Substratlösung entfernt, die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und zunächst 10 min auf einen Röntgenfilm exponiert. Nach Entwicklung des ersten Films entscheidet man über weitere Expositionszeiten.

10x PBS: 0,58 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,17 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,68 M NaCl
In deionisiertem Wasser lösen, pH auf 7,3-7,4 einstellen und autoklavieren.

Waschpuffer: PBS mit 0,1% Tween 20

Blockierungspuffer: PBS mit 0,1% Tween 20 und 0,2% I-Block durch vorsichtiges Erwärmen lösen. Nicht kochen.

Kit: Western-LightTM Chemiluminescent Detection System, Tropix

Assaypuffer: 0,1 M Diethanolamin
1 mM MgCl_2
pH mit 1 M HCl auf 10 einstellen.

N-Block: 5% N-Blockreagenz (Bestandteil des Kits) in Assaypuffer.
Substratpuffer: 1 ml Assaypuffer + 10 μ l CDP*-Stocklösung

4.5 ZELLKULTUR

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

4.5.1 KULTIVIERUNG VON GLIOMAZELLINIEN

Gewebekulturzellen werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen entnimmt man ein Röhrchen und inkubiert es bei 37°C im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen ist. Man überführt die Zellen dann sofort in eine mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche. Sie werden in ca. 10 ml Medium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Das Wachstum der Zellen wird jeden Tag unter dem Mikroskop überprüft. Wenn die Zellzahl zu dicht wird, muß man die Zellen in eine größere Flasche umsetzen oder einen Teil ernten. Adhärente Zellen wie die hier gezüchteten Gliomazellen müssen vor dem Umsetzen abgelöst werden. Das geschieht durch Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung (T.E.) bei 37°C im Brutschrank. Man wäscht die Zellen einmal mit PBS und gibt dann einige ml T.E. zu, so daß der Boden der Flasche bedeckt ist. Wenn sich die Zellen durch leichtes Klopfen am Boden der Kulturflasche ablösen (bei den verwendeten Zelllinien beginnt dies nach 1-2 min) beendet man die T.E.-Behandlung durch Zugabe von 10-15 ml Medium. Man pipettiert auf und ab, löst dabei die Zellen vom Flaschenboden und resuspendiert sie sorgfältig. Dies dient zur Vorbereitung der Zellzahl-Bestimmung. 10 μ l der Zellsuspension, oder einer Verdünnung werden 1:2 mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Man zählt nur die lebenden Zellen, d.h. diejenigen, die nicht mit Trypanblau angefärbt sind. Die Zellzahl wird nach folgender Gleichung bestimmt:

Zellen/ml = Mittelwert der Zellen in 4 Großquadraten x Verdünnungsfaktor x 10⁴,

wobei 10⁴ die Umrechnung von 0,1 μ l, dem Volumen in einem Großquadrat der Zählkammer, auf 1 ml darstellt.

Ein Teil der so behandelten Zellen wird geerntet, also 5 min bei 1000 rpm sedimentiert, mit PBS gewaschen und weiterbehandelt (DNS/RNS-Isolierung) oder bis dahin bei -80°C als Sediment eingefroren. Die restlichen Zellen kann man dann je nach Bedarf entweder wieder aussäen oder lebend einfrieren. Dazu zentrifugiert man sie 10 min (1100 rpm, 4°C). Das Sediment

wird in eisgekühltem Einfriermedium suspendiert, man stellt die Zellzahl auf ca. 10^6 - 10^7 pro ml ein und transferiert die Suspension in sterile Kryoröhrchen. Diese werden über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in den Stickstofftank überführt.

Kulturmedium:	RPMI 1640 + Glutamin, komplettiert mit 10% FCS 1 mM Natrium-Pyruvat 50 U/ml Penicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
Trypsin-EDTA-Lösung:	0,05% Trypsin; 0,02% EDTA In PBS, pH 8,0 ansetzen.
Trypanblau:	0,5% Trypanblau in PBS
PBS:	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1,8 mM KH_2PO_4 Mit bidest. Wasser ansetzen, pH auf 7,4 einstellen und autoklavieren.
Einfriermedium:	10% DMSO 20% FCS 70% RPMI

4.5.2 STIMULIERUNG VON GLIOMAZELLINIEN MIT $\text{IFN}\gamma$, IL4 UND IL6

Zu 50-60% konfluente Zellen wurden für 48 Stunden mit 400 Units $\text{IFN}\gamma$ pro ml Medium stimuliert. Die Zellen wurden nach 11 Stunden mit je 10 ml Medium gefüttert, nach 48 Stunden abtrypsiniert und geerntet. Die Zellsedimente wurden bei -80°C bis zur RNS-Isolierung aufbewahrt. Die Stimulationen der Zelllinien mit IL4 und IL6 wurden von Sabine Maier durchgeführt. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit je 500 Units IL4 bzw. IL6 pro ml Medium inkubiert und wie oben beschrieben behandelt.

$\text{IFN}\gamma$:	human rekombinant (Tebu, Frankfurt am Main)
IL4:	human rekombinant (Institut für Immunologie, LMU München)
IL6:	human rekombinant (Promocell, Heidelberg)

5 ERGEBNISSE

5.1 DIE GENOMISCHE ORGANISATION DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Eines der wichtigsten Ziele der Arbeit war die Aufklärung der genomischen Organisation der Faktor H-Genfamilie. Liegen alle Gene, die für die bisher entdeckten Proteine und mRNS kodieren in derselben Region auf Chromosom 1q32? Wenn ja, wie sind die Gene angeordnet und wie eng sind sie gekoppelt? Gibt es noch weitere HF1-verwandte Gene? Um diese Fragen beantworten zu können, wurden 6 YAC- und 4 BAC-Klone isoliert und mit verschiedenen Mitteln charakterisiert, um letztendlich eine auf Restriktionsanalyse basierende Genkarte der Region zu erhalten.

5.1.1 ANALYSE VON FAKTOR H-YAC-KLONEN

Ausgangspunkt für die Analyse der Faktor H-Genfamilie waren 6 Mega YAC-Klone (Research Genetics), die aus der humanen Mega YAC-Bibliothek der Firma isoliert wurden (Kap. 4.2.1-4.2.3). Die erste Charakterisierung der YAC-Klone erfolgte mit PCR: es wurden verschiedene für HF1, 2, 3, 4 und HF5 spezifische Oligonukleotidpaare verwendet (Kap. 3.6).

Der YAC G1 wurde erst später isoliert und daher wurden nicht alle einleitenden Charakterisierungsansätze mit ihm durchgeführt.

5.1.1.1 DIFFERENZIERUNG VON HF1- UND HF2-GENSEGEMENTEN ÜBER PCR UND PVU II-VERDAU

Zum besseren Verständnis der Oligonukleotidbezeichnungen und der PCR-Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung die amplifizierten Gensequenzen von HF1, HF2, HF3, HF4 und HF5 mit den verwendeten Oligonukleotiden (Kap. 3.6) und Amplifikatgrößen aufgeführt. Die PCR-Ergebnisse sind anschließend in Tabelle 1 zusammenfaßt.

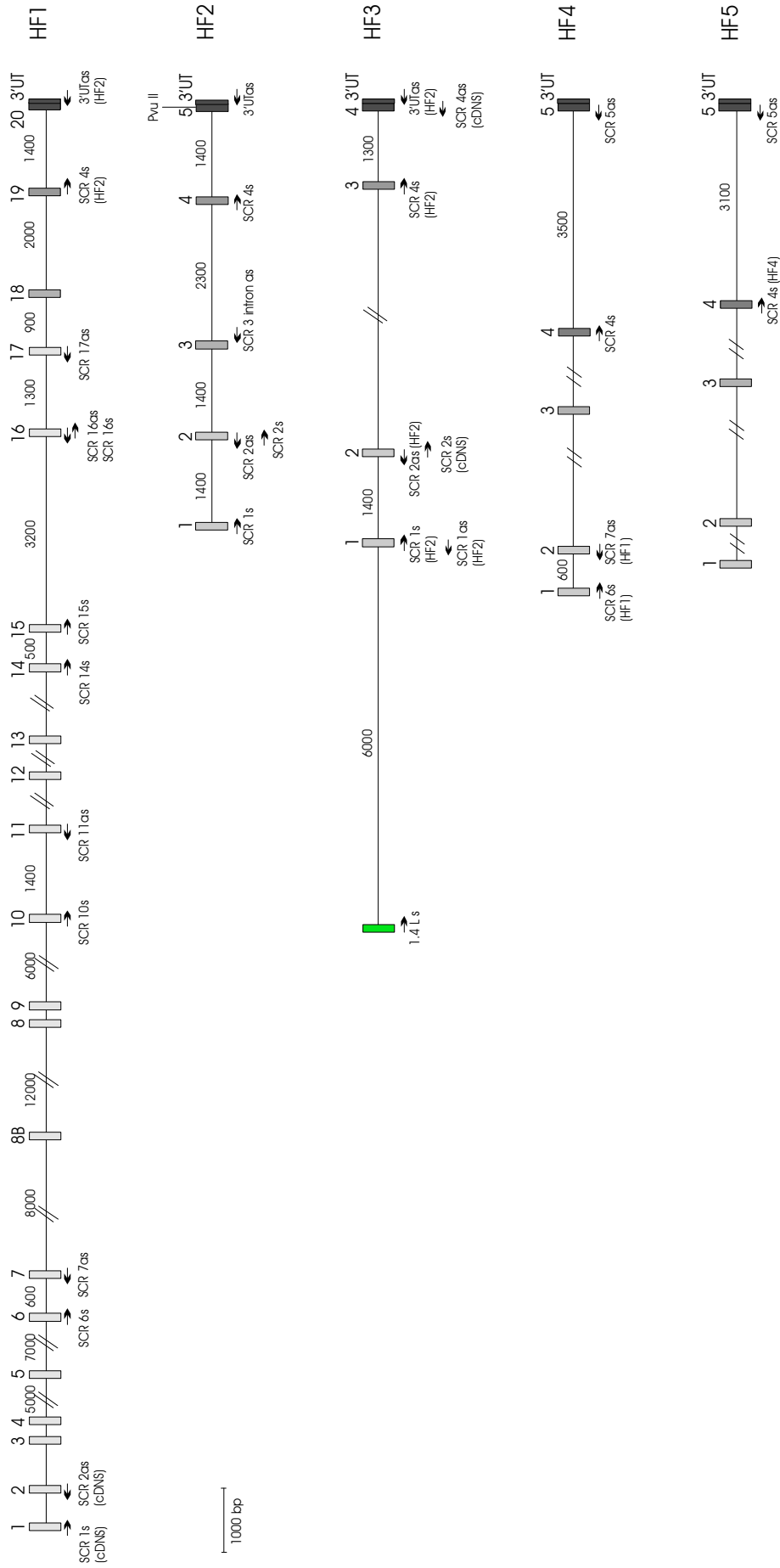


Abbildung 9: Die Gene der Faktor H-Familie mit den zur PCR-Amplifikation verwendeten Oligonukleotiden.

Von den Genen HF1, HF2, HF3, HF4 und HF5 wurden verschiedene Abschnitte mit PCR amplifiziert. Die Exonsequenzen der Gene, benannt nach den kodierten SCR-Domänen, sind durch Kästchen und Oligonukleotide durch Pfeile dargestellt. Die Pfeilspitze weist in Richtung 3'-OH-Ende der Oligonukleotidsequenz (Sequenzen siehe Kap. 3.6). Bei Oligonukleotiden, die nur cDNS amplifizieren können, ist dies in Klammern vermerkt. Manche Oligonukleotide sind nicht genspezifisch. Sie tragen dann zusätzlich die Bezeichnung des Gens, von dem sie abgeleitet wurden, in Klammern. Die Größenangaben der amplifizierten Bereiche sind in bp angegeben. Die Abbildung nimmt Ergebnisse dieser Arbeit vorweg.

Tabelle 1: PCR-Ergebnisse der Faktor H YAC-Klone

Oligonukleotidpaare	YAC A8	YAC B2	YAC C2	YAC G1	YAC H5	YAC F9
HF1/4: SCR6s/7as	600 bp	600 bp	600 bp	600 bp	600 bp	600 bp
HF1: SCR10s/11as	1500 bp	1500 bp	1500 bp	1500 bp	1500 bp	-
HF1: SCR14s/16as	3700 bp	3700 bp	3700 bp	3700 bp	3700 bp	-
HF1: SCR15s/16as	3200 bp	3200 bp	3200 bp	3200 bp	3200 bp	-
HF1: SCR16s/17as	1300 bp	1300 bp	1300 bp	1300 bp	1300 bp	-
HF1/2: SCR4s/3'UTas HF3: "	1400 bp 1300 bp	1400 bp 1300 bp	1400 bp -	1400 bp 1300 bp	1400 bp 1300 bp	1400 bp 1300 bp
HF2/3: SCR1s/2as	1400 bp	-	-	1400 bp	-	1400 bp
HF2: SCR2s/3 intron as	1400 bp	-	-	1400 bp	-	1400 bp
HF4: HF4 4s/HF4 5as HF5: "	3500 bp 3100 bp	- 3100 bp	- 3100 bp	3500 bp 3100 bp	- 3100 bp	3500 bp 3100 bp
HF5: HF4 4s/HF5 5as	3100 bp	3100 bp	3100 bp	3100 bp	3100 bp	3100 bp
F13B: C/D	200 bp	200 bp	-	200 bp	200 bp	200 bp

In der ersten Spalte sind die verwendeten Oligonukleotidpaare aufgelistet (Sequenzen und PCR-Bedingungen siehe Kap. 3.6). Die sechs weiteren Spalten beinhalten die Größen der Amplifikate, die für die untersuchten YAC-Klone erhalten wurden. Sind zwei Größen, z.B. bei HF4, in einer Spalte angegeben, wurden zwei unterschiedlich große Amplifikate in der PCR-Reaktion erzeugt. »-« steht für fehlendes PCR-Produkt, d.h. der zu amplifizierende Genabschnitt befindet sich nicht auf dem YAC. Manche Oligonukleotidpaare sind nicht genspezifisch (SCR6s/7as, SCR4s/3'UTas, SCR1s/2as und HF4 4s/5as). Die Größen und die Herkunft der zusätzlichen PCR-Amplifikate sind dann in der zweiten Zeile angegeben.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß nur die YAC A8 und G1 positiv für alle getesteten Oligonukleotide zur Amplifikation der HF1-Genfamilie und des Gens für F13B sind. Die YAC B2 und H5 sind positiv für HF1 und F13B, ihnen fehlen jedoch die HF2- und HF4-spezifischen Amplifikate. Dies könnte bedeuten, daß diese YAC nur einen Teil der HF1-Genfamilie enthalten und deshalb HF2 und HF4 fehlen. Es könnte jedoch auch ein Hinweis auf Chimärismus dieser YAC oder das Vorhandensein einer internen Deletion sein. Der Klon C2 zeigt HF1- und HF5-spezifische Amplifikate, wogegen HF2, HF4 und F13B nicht nachweisbar sind. Ebenso wie bei den YAC B2 und H5 könnte dies auf Chimärismus bzw. Deletionen hinweisen. Auch F9 enthält nicht alle getesteten Genabschnitte: es fehlen die HF1-spezifischen PCR-Produkte. Dieses YAC sollte an einem Ende kürzer sein als die anderen und mit A8 und G1 überlappen. Eine zusätzliche Bestätigung der Anwesenheit des 3'-Endes von HF1, HF2 und HF3 erhält man durch PCR-Amplifikation mit dem Oligonukleotidpaar SCR4s/3'UTas (die Bezeichnung ist vom

HF2-Gen abgeleitet). Die 3'-Enden dieser Gene können in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Die von HF1 und HF2 stammenden Amplifikate sind gleich groß (1400 bp), das HF3-spezifische Produkt ist kleiner (1300 bp). Das HF2-spezifische Produkt kann mittels Restriktionsverdau mit Pvu II vom HF1-spezifischen PCR-Produkt unterschieden werden (siehe auch Kap. 5.3). Pvu II schneidet nur im Genabschnitt von HF2 und verkürzt das Amplifikat um 244 bp. Wird das Amplifikat nicht geschnitten, kann man davon ausgehen, daß HF2 bzw. dessen 3'-Ende in der amplifizierten DNS fehlt. Die Ergebnisse für die 6 YAC sind in Abbildung 10 dargestellt.

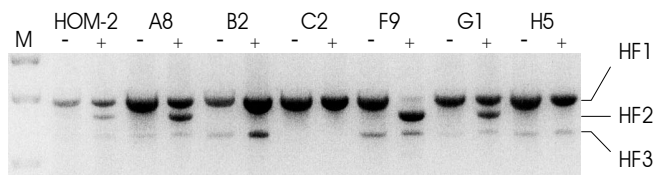


Abbildung 10: Pvu II-Restriktion der amplifizierten 3'-HF-Genabschnitte.

Pvu II-Restriktion der Amplifikate mit den Oligonukleotiden SCR4s/3'UTas aus den YAC-Klonen und der genomischen Kontroll-DNS. Es sind jeweils unverdautes (-) und Pvu II-verdautes (+) Amplifikat der getesteten DNS aufgetragen. In den ersten beiden Spuren befindet sich die Kontroll-DNS (humane B-LCL HOM-2), daran anschließend die getesteten YAC-DNS. »M« bezeichnet den Molekulargewichtsstandard in der linken äußeren Spur. An der rechten Seite der Abbildung ist die Genzuordnung der Banden angegeben. Das von HF1 stammende Amplifikat hat eine Größe von 1400 bp, das mit Pvu II geschnittene, von HF2 stammende Produkt, ist um 244 bp kleiner und die HF3 spezifische Bande ist ca. 1300 bp groß. Ein HF3-spezifisches Fragment wird aus genomischer DNS nur in HF2-defizienten Genomen amplifiziert.

Die PCR-Amplifikate der Klone A8, G1 und F9 sind mit Pvu II restringierbar, d.h. das Amplifikat stammt zur Hälfte (bei A8 und G1) bzw. ausschließlich (bei F9) vom HF2-Gen. A8 und G1 tragen also die 3'-Enden von HF1 und HF2 und sind ebenso für das 3'-Ende von HF3 positiv. F9 fehlt das 3'-Ende von HF1, diejenigen von HF2 und HF3 sind vorhanden. Die Amplifikate der YAC H5, B2 und C2 werden von Pvu II nicht geschnitten. Ihnen fehlt folglich das 3'-Ende von HF2, wohingegen HF1 und im Falle von H5 und B2 dazu auch HF3 vorhanden sind.

	HOM-2	A8	B2	C2	F9	H5	G1
HF1	+	+	+	+	-	+	+
HF2	+	+	-	-	+	-	+
HF3	-	+	+	-	+	+	+

Tabelle 2: Hier sind die Ergebnisse des Pvu II-Verdaus der PCR-Amplifikate mit den Oligonukleotiden SCR4s/3'UTas, die für das 3'-Ende von HF1 und HF2 spezifisch sind und bei den YAC-DNS in geringerem Maße auch HF3 amplifizieren, zusammengefaßt. In der oberen Reihe sind die amplifizierten DNS aufgeführt, darunter die Ergebnisse

des Restriktionsverdau. +: Amplifikat anwesend, -: Amplifikat fehlt. Als Positivkontrolle wurde genomische DNS der humanen B-LCL HOM-2 eingesetzt. Das HF3-spezifische Amplifikat ist hier nicht sichtbar.

Aus den PCR-Ergebnissen und dem Pvu II-Verdau gewinnt man bereits einen Eindruck vom Gengehalt und von möglichen Überlappungen der YAC. Die Klone A8 und G1 sind bei allen PCR-Amplifikationen positiv, es ist also wahrscheinlich, daß sie alle getesteten Gene (oder Genabschnitte) enthalten. Außerdem kann man annehmen, daß diese YAC in einem großen Bereich überlappen. YAC F9 fehlen die HF1-spezifischen PCR-Produkte. Man kann annehmen, daß dieser Klon ebenfalls mit A8 und G1 überlappt, jedoch an einem Ende kürzer als diese Klone ist, oder, was weniger wahrscheinlich ist, eine interne Deletion trägt.

Der YAC, bei dem einige PCR-Reaktionen negativ sind, ist C2. Ihm fehlen die F13B-, HF2-, HF3- und HF4-spezifischen PCR-Produkte. C2 ist positiv für HF1 und HF5, was für eine Überlappung mit A8, G1 und eventuell F9 spricht. Die zwei Klone B2 und H5 liefern identische Ergebnisse in der PCR-Analyse: sie sind positiv für HF1-, HF5- und F13B-spezifische Sequenzen, wobei HF2 und HF4 nicht nachweisbar sind.

Es ist jedoch wahrscheinlich, daß einige der YAC chimärisch sind, da die Chimärismusrate von YAC bei 40-50 % liegt. Eine eindeutige Anordnung der Gene ist nicht aus den PCR-Ergebnissen ableitbar. Sie muß durch Restriktionskartierung, genspezifische Hybridisierung und Sequenzierung der PCR-Produkte ermittelt werden.

5.1.1.2 SEQUENZIERERGEBNISSE

Zur Überprüfung, ob die erhaltenen PCR-Produkte auch tatsächlich genspezifisch sind, wurden einige direkt sequenziert und mit den bekannten HF-Sequenzen verglichen. Alle Sequenzreaktionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Abbruchbasen auf dem Sequenziergerät der Firma ABI durchgeführt (Kap. 4.1.9). Die Sequenzvergleiche zwischen der HF-Sequenz und den Sequenzen, die aus den YAC isoliert wurden, befinden sich im Anhang. In der folgenden Tabelle sind die Amplifikate, die von beiden Seiten sequenziert wurden und die für die PCR verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Oligonukleotidpaare (Kap. 3.6)	YAC-Klon	Amplifikatgröße	sequenziertes Gen
HF1 SCR6s/7as (amplifiziert auch HF4)	A8 C2	600 bp "	HF1 und HF4 HF1
HF1 SCR16s /17as	C2	1300 bp	HF1
HF2 SCR2s/3as	A8 F9	1400 bp "	HF2a HF2a

HF2 SCR1s/2as (amplifiziert auch HF3)	A8	1400 bp	HF2 und HF3
	F9	"	HF2 und HF3
	B2	"	HF3
	H5	"	HF3
HF4/HF5 SCR4s/5as	C2	3100 bp	HF5

Tabelle 3: In der Tabelle sind die sequenzierten Amplifikate der YAC-Klone aufgeführt. Die Oligonukleotidpaare SCR6s/7as und HF2 SCR1s/2as amplifizieren HF1- und HF4- Genabschnitte bzw. HF2- und HF3-Genabschnitte. Da die Amplifikate die gleiche Größe haben, ist eine Differenzierung durch Sequenzierung möglich. Sind beide Gene vorhanden, wie z.B. bei YAC A8 SCR6/7, so erhält man in der Sequenz an Stellen mit Sequenzunterschied beide Basen übereinander. Mit den Oligonukleotiden HF2 SCR2s/3as wird nur das HF2-Gen amplifiziert, von dem 3 Allele (HF2a, b, c) bekannt sind. In den YAC liegt das HF2a -Allel vor.

Nach den Sequenziererergebnissen tragen die getesteten YAC-Klone folgende Gene:

A8 ist positiv für HF1-Sequenzen, trägt das HF2a-Allel und das HF3-Gen. HF2 und HF3 unterscheiden sich im sequenzierten DNS-Abschnitt nur in wenigen Basen. An diesen Stellen erhält man in der Sequenz übereinandergelagert beide Basen. Auch C2, B2 und H5 enthalten HF1-spezifische Sequenzen. Allen dreien fehlen HF2-Sequenzen, wobei B2 und H5 jedoch HF3 positiv sind. C2 ist weiterhin positiv für HF5. Der Klon F9 trägt wie A8 das HF2a-Allel und das HF3-Gen, ihm fehlen HF1-spezifische Sequenzen. Die Sequenziererergebnisse bestätigen die aus der Größe der Amplifikate abgeleiteten Genzuordnungen.

5.1.1.3 SOUTHERNBLOTHYBRIDISIERUNGEN: VERGLEICH YAC-DNS MIT GENOMISCHER DNS

Neben PCR und Sequenzierung zur Überprüfung des Gengehalts der YAC, sollten sie auch im Southernblot getestet werden, um feststellen zu können, ob sich Deletionen oder Umlagerungen in der HF1-Genfamilie befinden. Dazu wurde YAC-DNS (je 500 ng) im Vergleich mit genomischer DNS (je 10 µg) mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Bam HI und Pvu II) verdaut und auf einem TPE-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 4.1.3; 4.1.4). Das Gel wurde geblottet und der Blot mit einer Sonde, die HF1 und HF2 (SCR4s/3'UTas) entdeckt und mit HF3 kreuzreagiert, hybridisiert (Kap. 4.1.5). Als genomische Kontrollen wurde DNS zweier B-LCL verwendet. Die Zelllinie LUY enthält HF1 und HF2, wogegen OLGA eine Deletion des HF2-Gens trägt (Cannich, 1994). Aus den Hybridisierungsergebnissen kann man erkennen, daß nur YAC A8 alle die von der Sonde detektierten HF-Gene trägt (Abb. 11 und Abb. 12). Vergleicht man die YAC-Hybridisierungssignale mit den Signalen der genomischen Kontrollen, fällt auf, daß A8 ein vergleichbares Bandenmuster wie die Kontroll-DNS LUY zeigt, die wie erwähnt HF1 und HF2 Gene trägt. F9 fehlt die HF1-spezifische Bande, B2, C2 und H5 die HF2-spezifische. Diese Ergebnisse bestätigen die PCR-Ergebnisse (5.1.1.1). Bei F9 beobachtet man eine Bande (2500 bp X), die in den Spuren der humanen Kontrollen nicht zu sehen ist. Diese Bande könnte

vom 3'-Ende des HF1-Gens stammen, das zwar aufgrund der PCR-Ergebnisse in F9 nicht nachweisbar ist, jedoch mit einem Exon noch auf diesem Klon vorhanden sein muß.

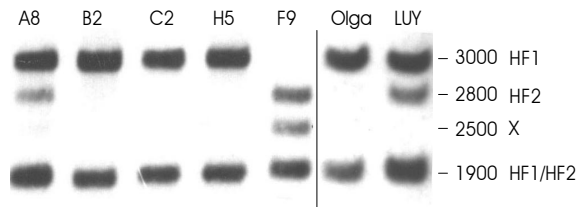


Abbildung 11: Genomischer Southernblot der YAC-DNS und humaner Kontroll-DNS.

In den ersten fünf Spuren ist DNS der 5 YAC-Klone, in den letzten 2 genomische DNS der humanen B-LCL OLGA und LUY aufgetragen. Die DNS wurde mit Bam HI und Pvu II restringiert. Der Southernblot wurde mit einer Sonde, die die 3'-Enden von HF1, HF2 und HF3 entdeckt, hybridisiert (SCR4s/3'UTas). Die von HF1 bzw. HF2 stammenden Fragmente sind am rechten Rand der Abbildung markiert, die Fragmentgrößen sind in bp angegeben (vergl. Abbildung 12). Auf die mit X markierte Bande wird im Text eingegangen. Die Expositionszeiten betragen für die YAC-DNS 1 h, für die genomische DNS 3 Stunden.

Zur Verdeutlichung der Southernblotergebnisse sind in der folgenden Abbildung die relevanten Genabschnitte mit den Bam HI- und Pvu II-Schnittstellen von HF1 und HF2 dargestellt. Die Bam HI-Fragmente, die mit der Sonde SCR4s/3'UTas hybridisieren, sind bei HF1 und HF2 gleich groß. Zur Differenzierung der 3'-Enden dieser Gene kann man zusätzlich mit Pvu II restringieren, welches nur im 3000 bp-Bam HI-Fragment von HF2 schneidet.

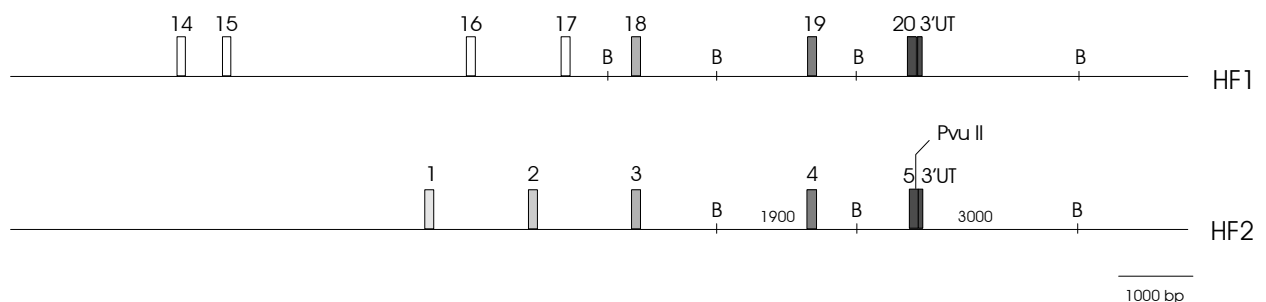


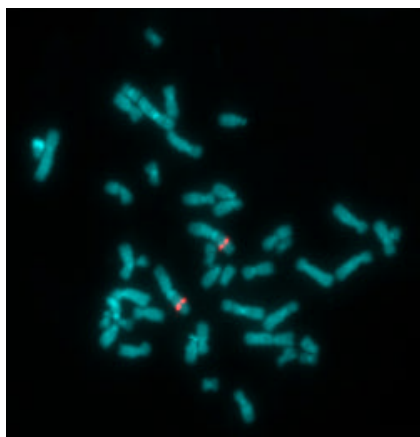
Abbildung 12: Restriktionskarten von HF2 und des 3'-Endes von HF1.

Exonsequenzen der Gene sind als Balken dargestellt, Intronsequenzen als Linien zwischen den Balken. Die Zahlen über den Exons beziehen sich auf die von ihnen kodierten SCR-Domänen. Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BamH I und P = Pvu II bedeuten. Es ist nur die Pvu II-Schnittstelle gezeigt, die für die Differenzierung von HF1- und HF2-Amplifikaten von Bedeutung ist.

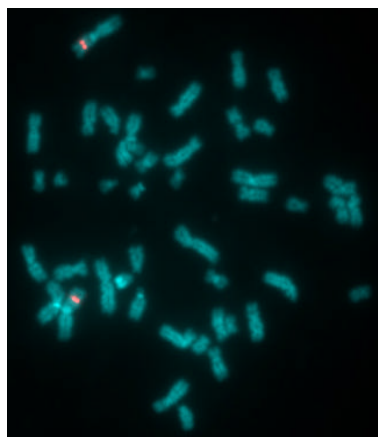
Die für den Southernblot eingesetzte Sonde (SCR4s/3'UTas PCR aus cDNS) umfaßt die SCR19 bzw. 4, 20 bzw. 5 und den 3'UT. Homologe Sequenzabschnitte sind durch gleiche Grauschattierungen gekennzeichnet.

5.1.2 TEST AUF CHIMÄRISMUS

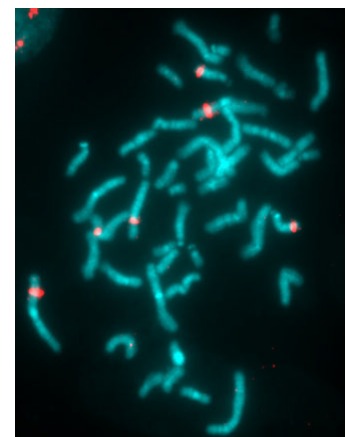
Da YAC-Klone herstellungsbedingt eine hohe Wahrscheinlichkeit haben chimärisch zu sein, wurden die YAC-Klone mittels Alu-PCR und nachfolgender Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der Sonden auf Metaphasechromosomen getestet. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Dr. Michael Speicher (Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU) durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß 2 (H5 und B2) der 5 untersuchten YAC-chimärisch sind, d.h. Signale auf mehreren homologen Chromosomen zeigen.



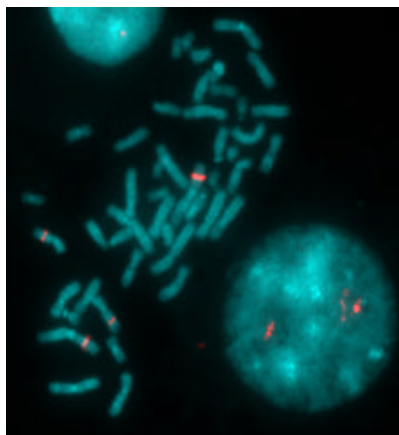
a) YAC A8



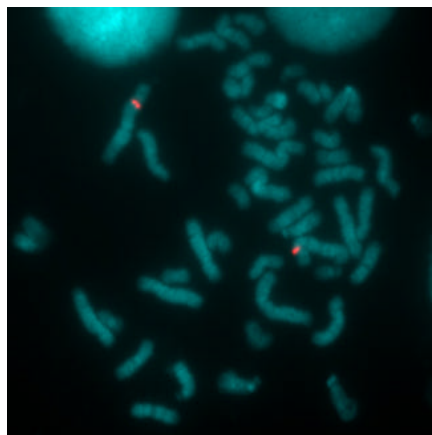
b) YAC C2



c) YAC H5



d) YAC B2



e) YAC F9

Abbildung 13: Test der YAC auf Chimärismus.

FISH mit Alu-PCR-Sonden der DNS der 5 YAC-Klone auf humane Metaphasechromosomen. Die Klone H5 (c) und B2 (d) sind chimärisch, da Fluoreszenzsignale auf den Chromosomen 1q32 und zwei bzw. einem weiteren homologen Chromosomenpaar zu sehen sind. Bei den nicht-chimärischen Klonen A8 (a), C2 (b) und F9 (e) hybridisieren die Alu-PCR-Sonden nur auf den homologen Abschnitten von Chromosom 1q32.

Nicht chimärisch waren die Klone A8, C2 und F9. Der YAC-Klon G1, der erst später von Research Genetics bestellt wurde, wurde nicht auf Chimärismus getestet. Aus den Restriktionskarten ist jedoch zu ersehen, daß er mit A8 überlappt und wahrscheinlich nicht chimärisch ist. Definitive Aussagen zur Überlappung der Klone lassen sich jedoch erst nach der Restriktionsanalyse machen, deren Resultate im anschließenden Kapitel dargestellt sind.

5.1.3 RESTRIKTIONSKARTEN DER YAC

Zur genomischen Kartierung der YAC wurden Restriktionsansätze mit zwei verschiedenen Enzymen, Mlu I und BssH II, die humane DNS nur selten schneiden, angesetzt. Die in Agarose immobilisierte DNS wurde wie unter 4.1.3.4 beschrieben restringiert – vollständig bis partial – und auf einem PF-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Southern-Transfer mit YAC-End-Sonden, die entweder den zentromerischen oder azentromerischen Vektorarm binden, hybridisiert (4.1.5.2). Man erhält dadurch nach der Immundetektion als Ergebnis der partiellen Restriktion eine »Leiter« von Banden, beginnend mit der kleinsten Bande, die den Vektorarm bis zur ersten Schnittstelle des Restriktionsenzym in der Insertion repräsentiert. Mit dieser Methode kann man von beiden Enden aus die Restriktionsschnittstellen bestimmen und gegebenenfalls, wenn das YAC nicht zu groß ist, eine Überlappung feststellen. Durch Vergleich mit den anderen kartierten YAC erhält man im Falle einer Überlappung der Klone eine Bestätigung der Lage der Schnittstellen und zum Teil eine Vergrößerung des kartierten Bereichs. Chimärische Klone zeigen teilweise Überlappung und dann wiederum Bereiche, die keine Ähnlichkeiten zu den nicht-chimärischen, überlappenden YAC zeigen. In den folgenden Abbildungen sind die Southernblothybridisierungen aller 6 YAC mit den zentromerischen und den azentromerischen Vektorsonden aufgeführt. Die davon abgeleiteten Restriktionskarten befinden sich unter den jeweiligen Hybridisierungsergebnissen.

YAC A8

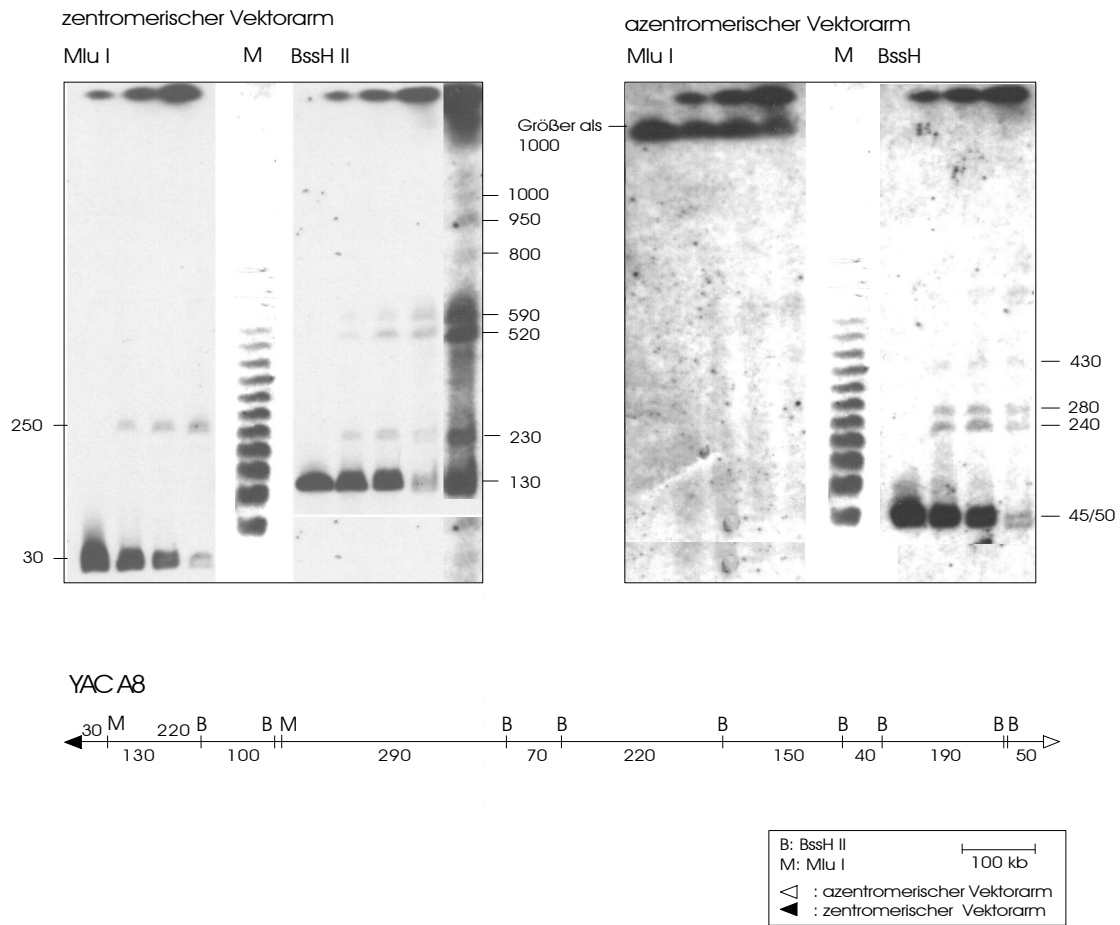


Abbildung 14: Kartierungsrestriktion von YAC A8 mit Mlu I und BssH II mit nachfolgender Southernblothybridisierung mit der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde. Von den Restriktionen mit den Enzymen Mlu I und BssH II sind in der linken äußeren Spur die vollständigen Ansätze (10 U Enzym), in den folgenden die unvollständigen (2, 1 und 0,5 U Enzym) Kartierungsansätze aufgetragen. Zwischen den Restriktionen mit Mlu I und BssH II befindet sich der Lambda-Concatamer-Längenstandard, die Spur ist mit einem M markiert. Die Expositionszeiten betragen drei Stunden, wenn dies nicht ausreichte um alle Banden zu sehen, wie im Falle von A8 BssH II zentromerischer Vektorarm, wurde über Nacht exponiert. Unter den Hybridisierungsdaten ist die davon abgeleitete Restriktionskarte des YAC A8 dargestellt. Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben.

YAC A8 konnte von beiden Seiten vollständig kartiert werden. Es hat eine Größe von ca. 1250 kb. Auffällig ist, daß es nur 2 Mlu I-Schnittstellen besitzt. Das größte Mlu I-Fragment ist ca. 1000 bp groß.

YAC B2

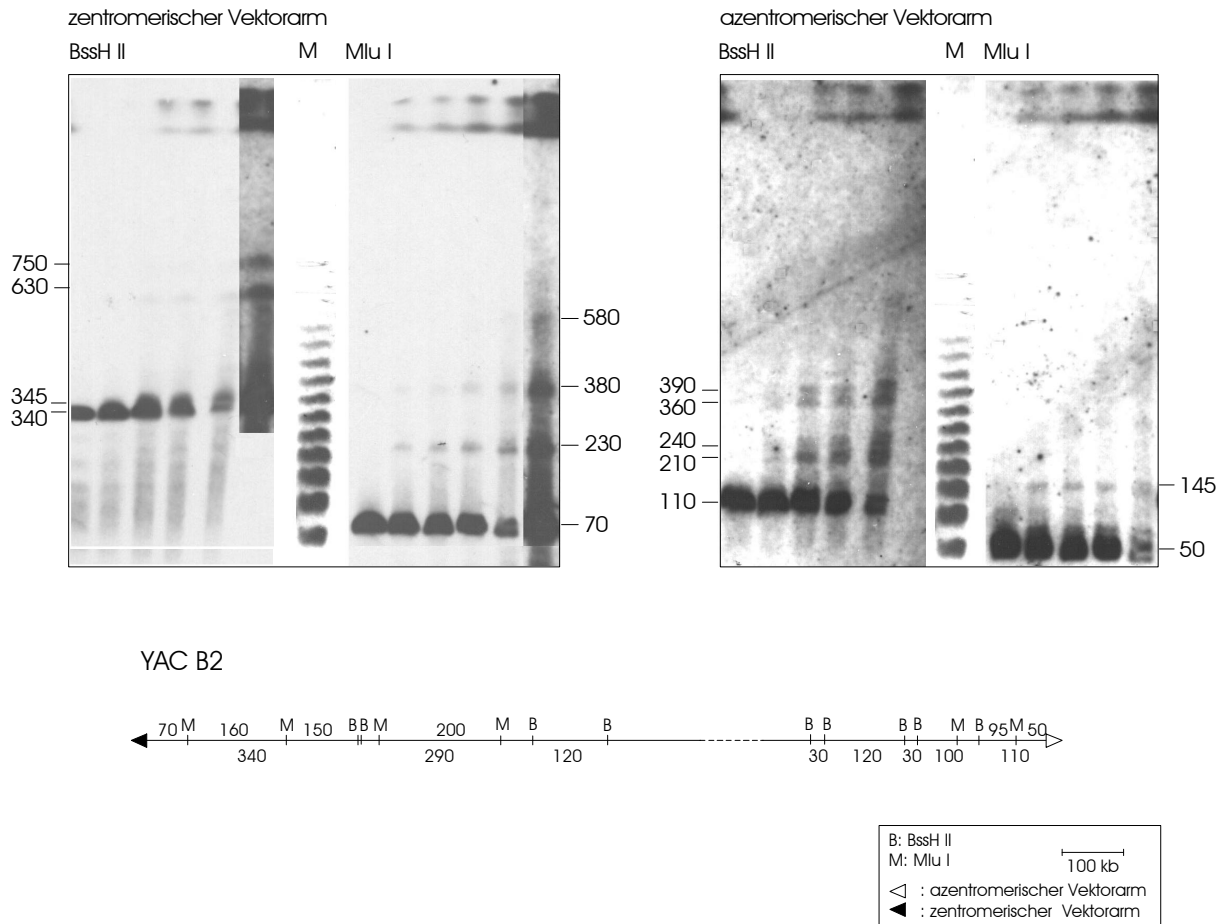


Abbildung 15: Kartierungsrestriktion von YAC B2 mit Mlu I und BssH II mit nachfolgender Southernblothybridisierung mit den zentromerischen und azentromerischen Vektorarm-Sonden.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde. Von den Restriktionsansätzen mit den Enzymen Mlu I und BssH II sind in der linken äußeren Spur die vollständigen Ansätze (10 U Enzym), in den folgenden die unvollständigen (2, 1 und 0,5 U Enzym) Kartierungsansätze aufgetragen. Die Expositionszeiten betragen drei Stunden, wenn dies nicht ausreichte um alle Banden zu sehen, wie im Falle von YAC B2 BssH II und Mlu I zentromerische Vektorarmsonde, wurde über Nacht exponiert. Unter den Hybridisierungsdaten ist die davon abgeleitete Restriktionskarte des YAC B2 dargestellt. Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Da sich aus den Hybridisierungsergebnissen keine Überlappung der Fragmente ergab, ist der mittlere Teil der Insertion gestrichelt dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben. Zwischen den Restriktionen befindet sich der Molekulargewichtstandard (Lambda-Concatamere), markiert mit einem M.

Der YAC B2 konnte mit diesem PF-Gel nicht vollständig kartiert werden, da keine überlappenden Fragmente gefunden wurden. Aufgrund des Chimärismus dieses YAC wurde kein weiteres Gel angefertigt. Man erkennt keine Überlappung mit YAC A8.

YAC C2

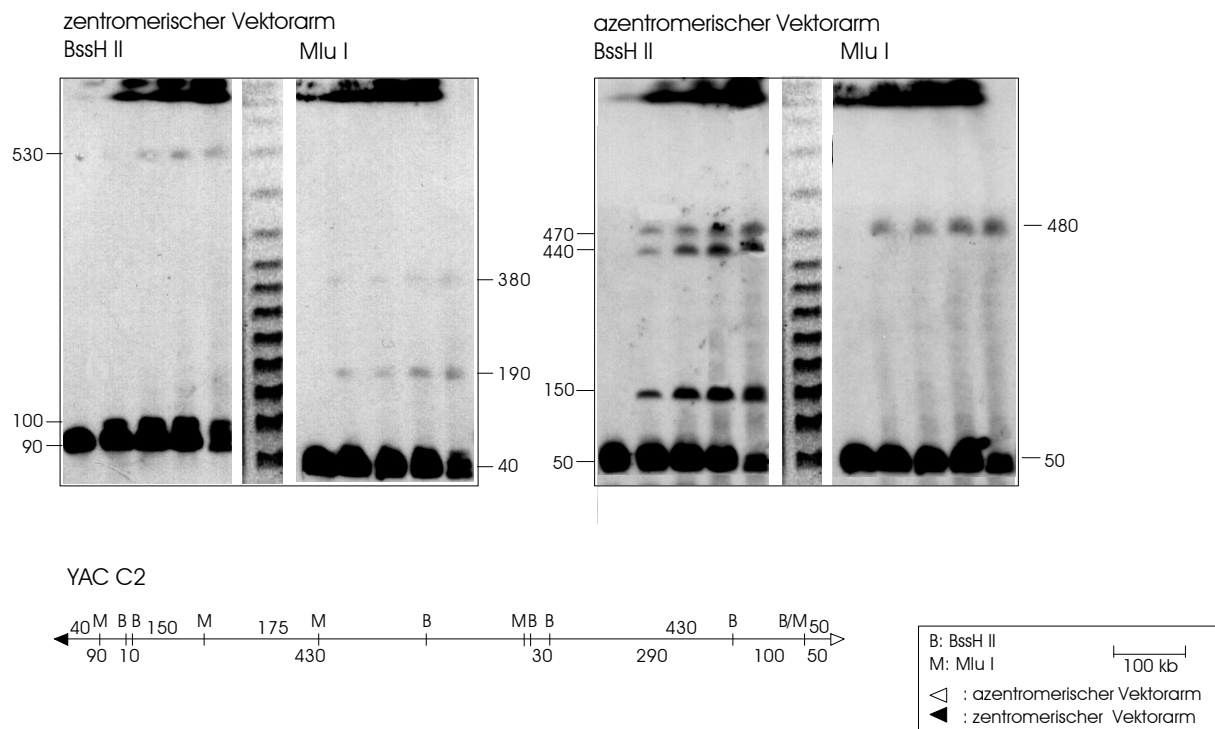


Abbildung 16: Kartierungsrestriktion von YAC C2 mit Mlu I und BssH II mit nachfolgender Southernblothybridisierung mit den zentromerischen und azentromerischen Vektorarm-Sonden.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde. Von den Restriktionen mit den Enzymen Mlu I und BssH II sind in der linken äußeren Spur die vollständigen Ansätze (10 U Enzym), in den folgenden die unvollständigen (2, 1 und 0,5 U Enzym) Kartierungsansätze aufgetragen. Unter den Hybridisierungsdaten ist die davon abgeleitete Restriktionskarte des YAC C2 dargestellt. Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben. Zwischen den BssH II- und Mlu I-Restriktionen ist der Molekulargewichtsstandard (Lambda-Concatamere), markiert mit »M«, aufgetragen.

Bei C2 war eine vollständige Kartierung möglich, die dargestellte Überlappung der DNS-Fragmente wurde mit einem zweiten PF-Gel (nicht gezeigt) mit stärkerer Auftrennung der Bande über 500 kb Größe bestätigt. C2 ist 1160 kb groß und zeigt eine von A8 verschiedene Restriktionskarte. Falls C2 mit A8 überlappen sollte, dann ist der betreffende Bereich vermutlich relativ klein.

YAC H5

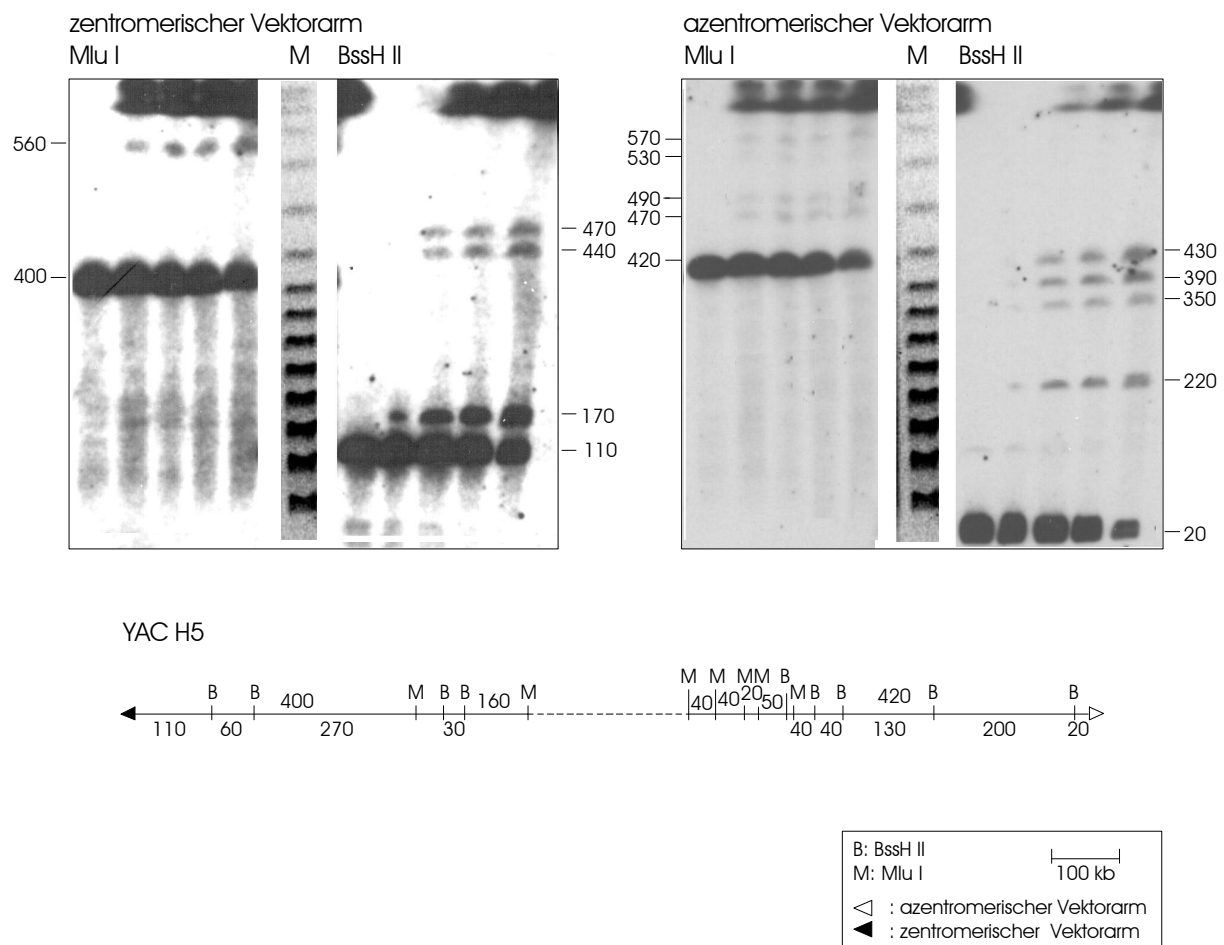


Abbildung 17: Kartierungsrestriktion von YAC H5 mit Mlu I und BssH II mit nachfolgender Southernblothybridisierung mit den zentromerischen und azentromerischen Vektorarm-Sonden.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde. Von den Restriktionen mit den Enzymen Mlu I und BssH II sind in der linken äußeren Spur die vollständigen Ansätze (10 U Enzym), in den folgenden die unvollständigen (2, 1 und 0,5 U Enzym) Kartierungsansätze aufgetragen. Unter den Hybridisierungsdaten ist die davon abgeleitete Restriktionskarte des YAC H5 dargestellt. Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben. Zwischen den BssH II- und Mlu I-Restriktionen sind Lambda-Concatamere, markiert mit einem »M«, als Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

H5 konnte mit diesem PF-Gel nicht vollständig kartiert werden. Da dieser YAC chimärisch ist, wurde auf eine weitere Analyse verzichtet. Auffallend ist, daß seine Restriktionskarte nicht mit den übrigen YAC überlappt und eine Häufung von BssH II- und Mlu I-Schnittstellen in der Nähe des azentromerischen Arms aufweist.

YAC F9

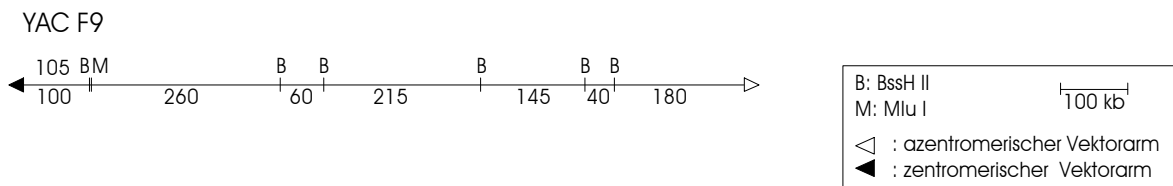
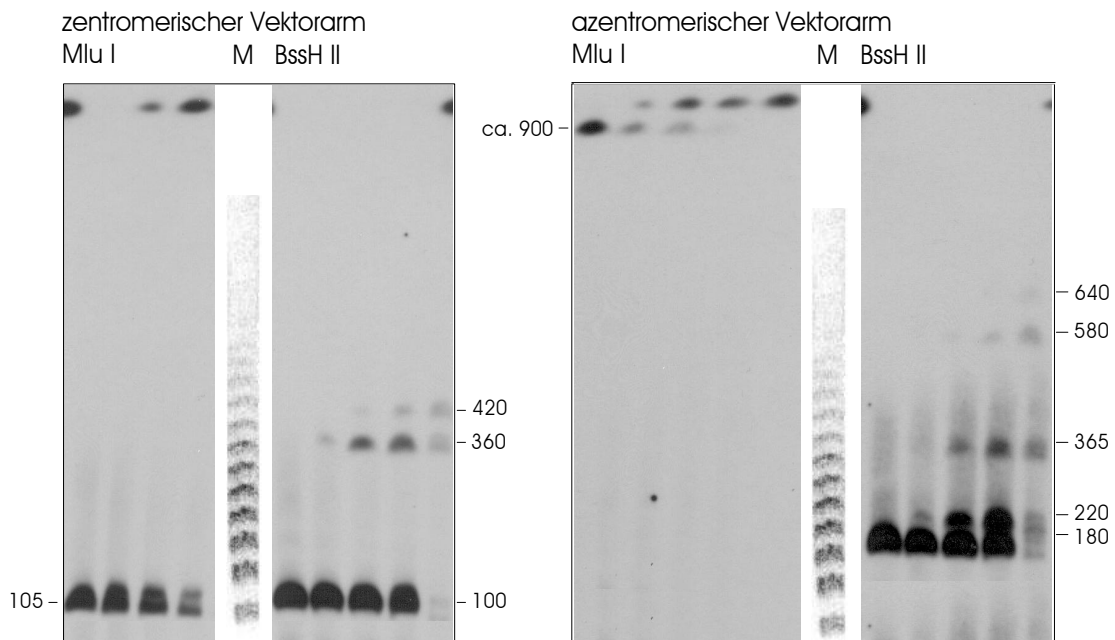


Abbildung 18: Kartierungsrestriktion von YAC F9 mit Mlu I und BssH II mit nachfolgender Southernblotthybridisierung mit den zentromerischen und azentromerischen Vektorarm-Sonden.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der zentromerischen und azentromerischen Vektorsonde. Von den Restriktionen mit den Enzymen Mlu I und BssH II sind in der linken äußeren Spur die vollständigen Ansätze (10 U Enzym), in den folgenden die unvollständigen (2, 1 und 0,5 U Enzym) Kartierungsansätze aufgetragen. Unter den Hybridisierungsdaten ist die davon abgeleitete Restriktionskarte des YAC F9 dargestellt. Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben. Zwischen den BssH II- und Mlu I-Restriktionen sind Lambda-Concatamere als Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Diese Spuren sind mit einem »M« markiert.

F9 ist ca. 900 kb groß und konnte vollständig kartiert werden. Dieser YAC hat wie A8 ein großes Mlu I-Fragment, was für eine Überlappung der beiden Klone spricht. In Bezug auf die BssH II-Schnittstellen scheint F9 eine an beiden Enden verkürzte Insertion von A8 zu enthalten.

YAC G1

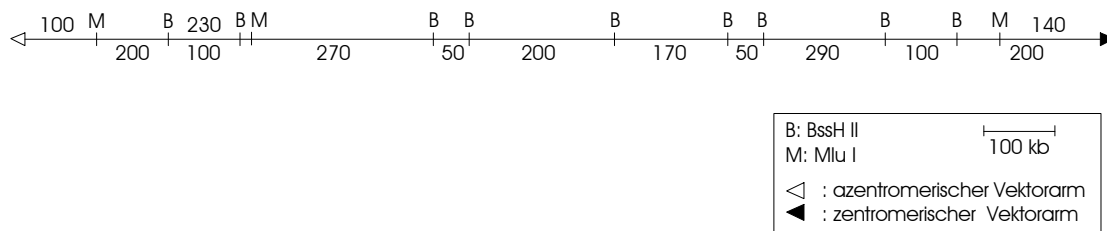


Abbildung 19: Restriktionskarte des YAC-Klons G1

Die Vektorarme sind durch Dreiecke symbolisiert, die genomische DNS-Insertion durch eine Linie. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die Fragmentlängen befinden sich für BssH II unter, für Mlu I über der Linie. Die Längen sind in kb angegeben.

Vom YAC G1 ist nur die Restriktionskarte dargestellt, da die dazugehörigen Southernblots zu lange exponiert werden mußten und deshalb nicht eingescannt werden konnten.

Vergleicht man die Restriktionskarten, so fällt auf, daß die Klone A8, F9 und G1 miteinander überlappen. Auch die Klone B2 und C2 können zur Überlappung gebracht werden, wogegen H5 weder mit der einen noch der anderen Gruppe zur Deckung gebracht werden kann. Auf eine weitere Analyse dieses Klons wurde verzichtet. Im Folgenden wird nur noch auf die Klone A8, B2, C2, G1 und F9 eingegangen.

5.1.3.1 AUFFINDEN DER HF-GENE AUF DEN YAC

Nachdem die Restriktionskarten der YAC zur Verfügung standen, wurden dieselben Southernblots mit verschiedenen Sonden hybridisiert, um die interessierenden Gene Restriktionsfragmenten zuordnen zu können. Alle verwendeten Sonden, die über PCR gewonnen und markiert wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (siehe auch Abbildung 9). Die zugehörigen Southernblothybridisierungsergebnisse befinden sich in den Abbildungen unter der Tabelle.

Tabelle 4: Sonden für die Southernblothybridisierungen

Sonde	DNS-Quelle	detektierte Gene
HF1 SCR1s/2as	Leber cDNS	HF1
HF1/HF2 SCR4s/3'UTas	Leber cDNS	HF1, HF2 und schwach HF3
HF2 SCR1s/2as	genomische DNS	HF2 und HF3
HF3 2s/4as	Leber cDNS	HF3 und schwach HF2
HF4 SCR4s/SCR5as	Leber cDNS	HF4 und HF5

HF5 SCR4s/SCR5as	Leber cDNS	HF5 und HF4
F13B C-D	genomische DNS	F13B

YAC A8

Der YAC-Klon A8 hybridisiert mit allen verwendeten Sonden. Am zentromerischen Vektorarm

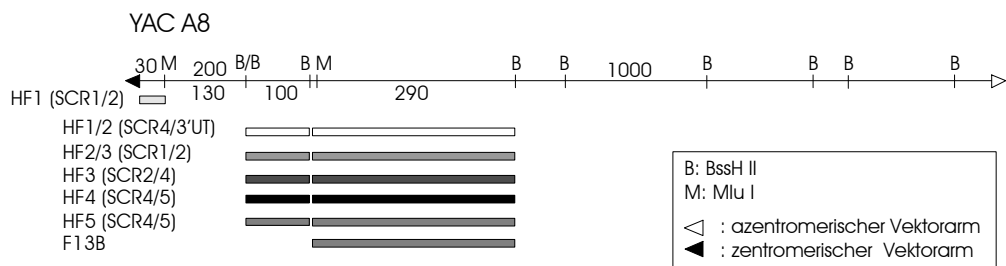
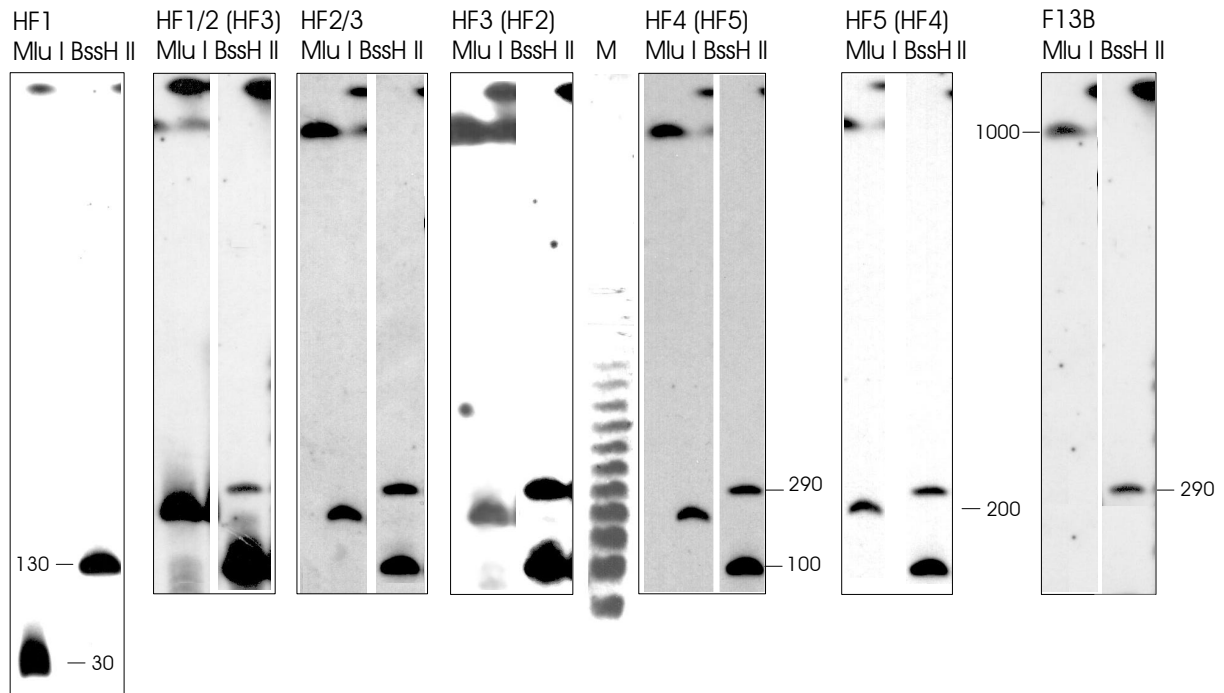


Abbildung 20: Hybridisierungsergebnisse und Restriktionskarte von YAC A8

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der vollständigen Restriktionen mit BssH II und Mlu I. Die Fragmentgrößen, an den Seiten der Abbildungen angegeben, sind in kb zu lesen. Im unteren Teil ist die Restriktionskarte des YAC abgebildet. Unter der Karte befinden sich die Hybridisierungssignale der verschiedenen Sonden, symbolisiert durch Kästchen in unterschiedlichen Farben (Legende siehe linke untere Ecke). Es wurde jeweils die kleinsten hybridisierenden Fragmente gekennzeichnet. Die meisten HF-Sonden sind in der Hybridisierung nicht genspezifisch. Die Gene, mit denen diese Sonden kreuzreagieren, sind in Klammern angegeben. Die Fragmentgrößen befinden sich im Falle von Mlu I über der Restriktionskarte, im Falle von BssH II unter derselben. Als Molekulargewichtsstandard (»M«) wurden Lambda-Concatamere aufgetragen.

ist das 5'-Ende des HF1-Gens lokalisiert. Daran anschließend folgt die Hybridisierung des HF2-Gens auf einem 100 kb großen BssH II-Fragment. Mit demselben Fragment reagieren auch die Sonden für die Gene HF3, HF4 und HF5. Diese Sonden reagieren auch mit dem folgenden 290 kb großen BssH II-Fragment. Die F13B-Sonde hybridisiert ausschließlich mit dem 290 kb BssH II-Fragment. Aus den Daten ist folglich keine definitive Genanordnung festlegbar.

YAC F9

Die Hybridisierungssignale des YAC F9 sind vergleichbar mit denen des Klons A8. Im Gegensatz

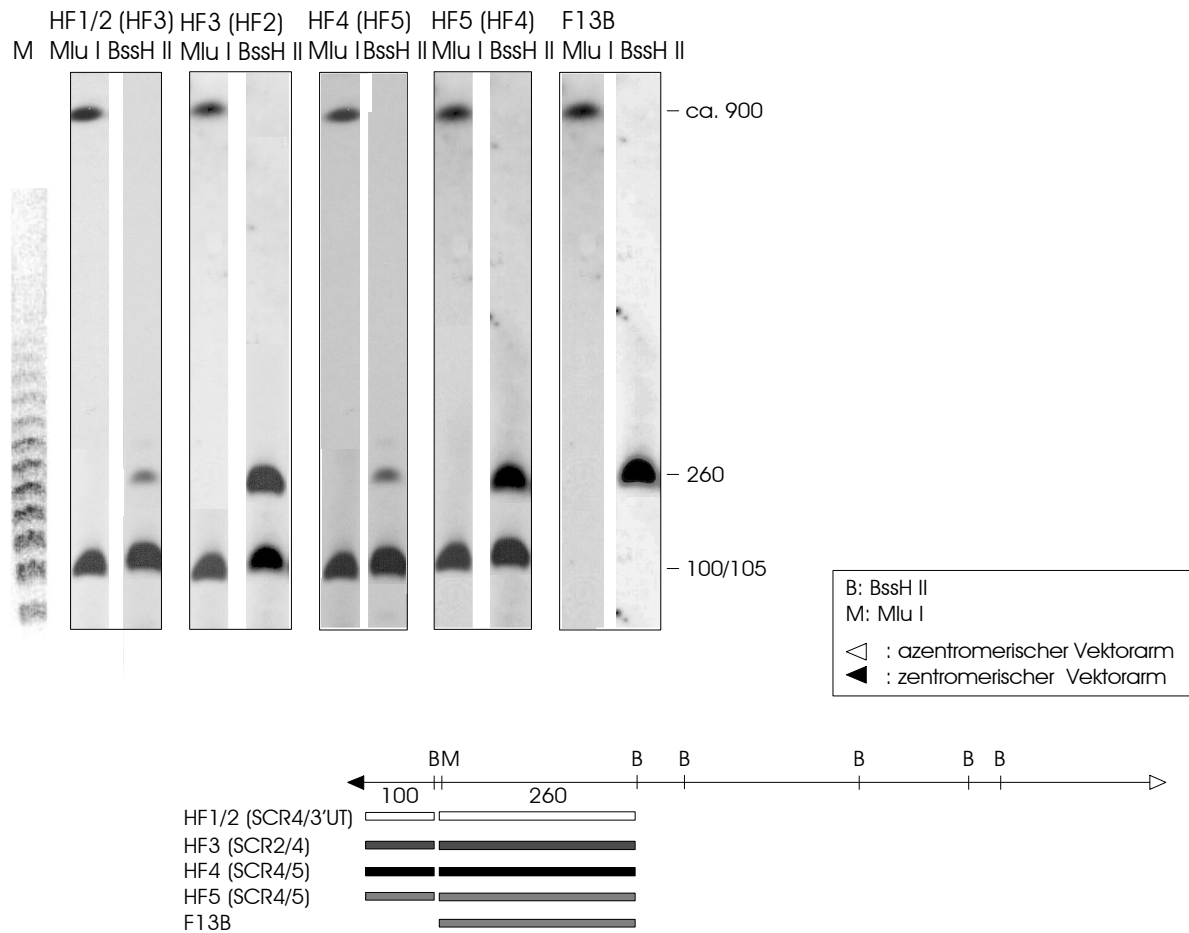


Abbildung 21: Hybridisierungsergebnisse und Restriktionskarte von YAC F9

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der vollständigen Restriktionen mit BssH II und Mlu I. Die Fragmentgrößen, an den Seiten der Abbildungen angegeben, sind in kb zu lesen. Im unteren Teil ist die Restriktionskarte des YAC abgebildet. Unter der Karte befinden sich die Hybridisierungssignale der verschiedenen Sonden, symbolisiert durch Kästchen in unterschiedlichen Farben (Legende siehe linke untere Ecke). Es wurde jeweils die kleinsten hybridisierenden Fragmente gekennzeichnet. Die meisten HF-Sonden sind in der Hybridisierung nicht genspezifisch. Die Gene, mit denen diese Sonden kreuzreagieren, sind in Klammern angegeben. Die Fragmentgrößen befinden sich im Falle von Mlu I über der Restriktionskarte, im Falle von BssH II unter derselben. Als Molekulargewichtsstandard (»M«) wurden Lambda-Concatamere aufgetragen.

zu diesem YAC fehlen F9 jedoch die HF1-spezifischen Hybridisierungssignale: er reagiert nicht

mit der Sonde für HF1 SCR1/2 und war wie bereits beschrieben in der PCR negativ für alle HF1-spezifischen Amplifikationen.

YAC C2

Das YAC C2 zeigt Hybridisierungssignale mit den Sonden für HF1, HF4, HF5 und der Sonde die sowohl das HF1- als auch das HF2-Gen erkennt und mit dem HF3-3'-Ende kreuzreagiert

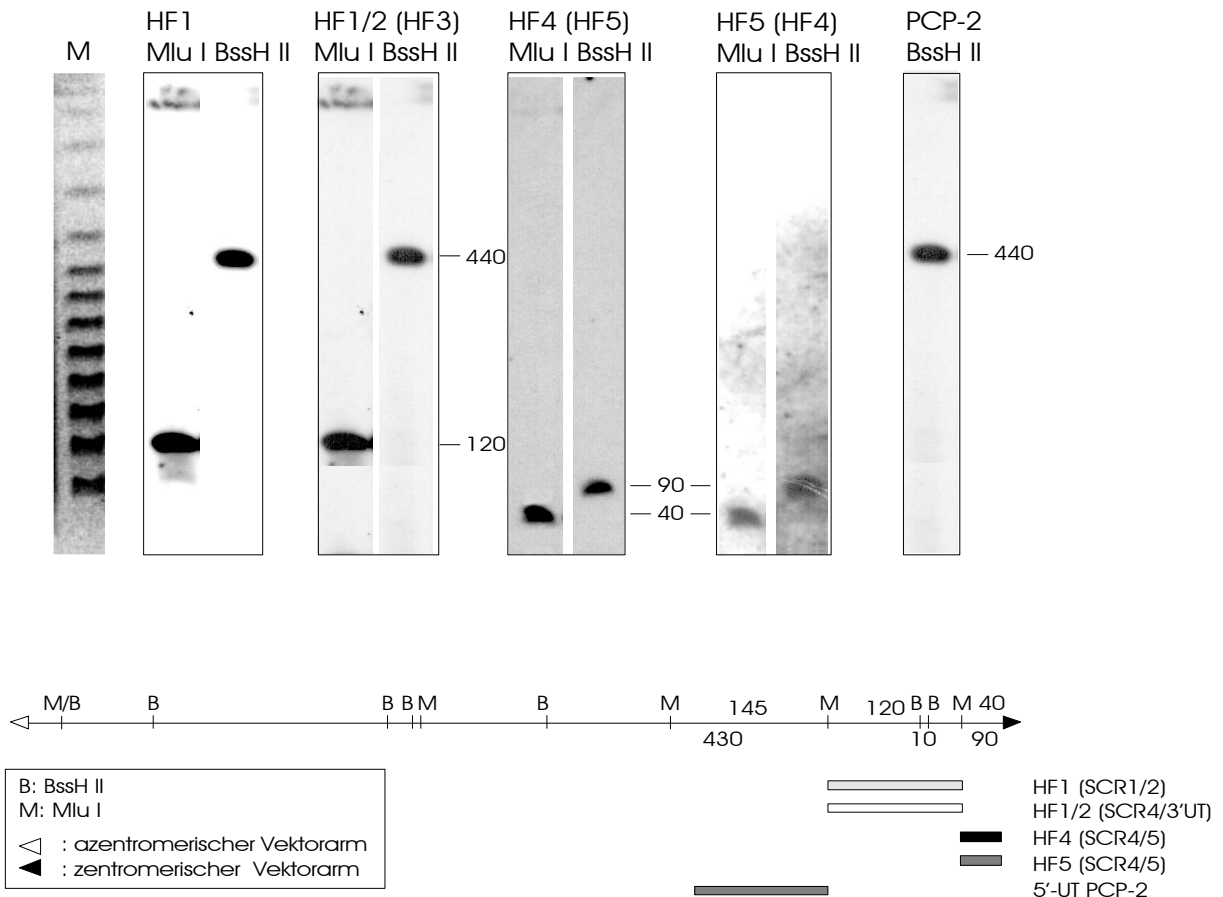


Abbildung 22: Hybridisierungsergebnisse und Restriktionskarte von YAC C2

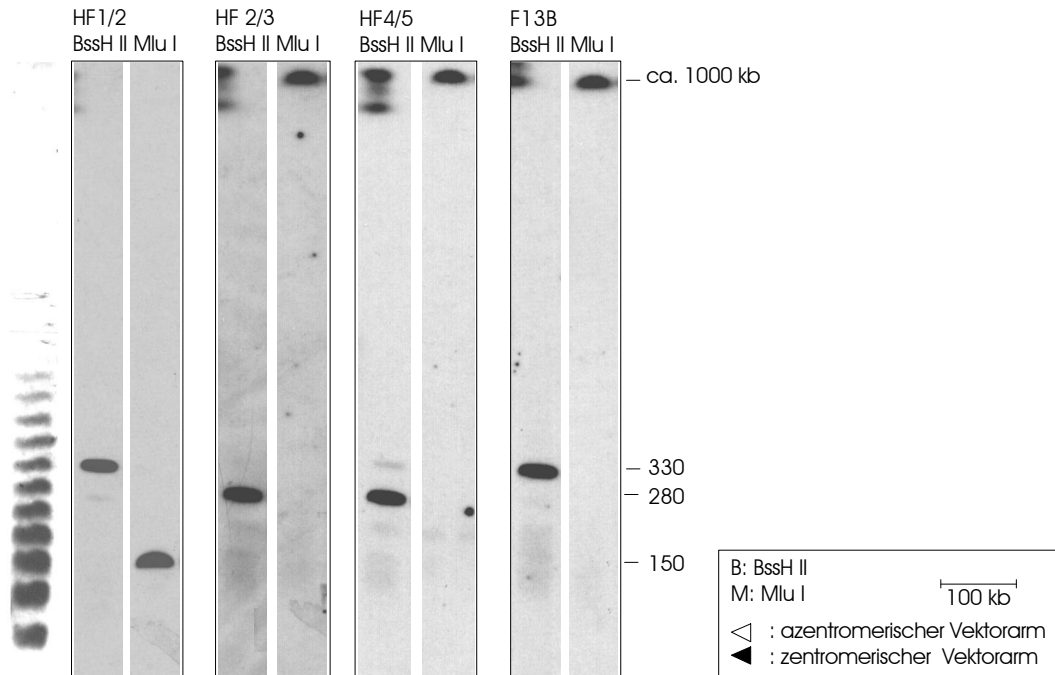
Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der vollständigen Restriktionen mit BssH II und Mlu I. Die Fragmentgrößen, an den Seiten der Abbildungen angegeben, sind in kb zu lesen. Im unteren Teil ist die Restriktionskarte des YAC abgebildet. Unter der Karte befinden sich die Hybridisierungssignale der verschiedenen Sonden, symbolisiert durch Kästchen in unterschiedlichen Farben (Legende siehe rechte untere Ecke). Die meisten HF-Sonden sind in der Hybridisierung nicht genspezifisch. Die Gene, mit denen diese Sonden kreuzreagieren, sind in Klammern angegeben. Es wurde jeweils die kleinsten hybridisierenden Fragmente gekennzeichnet. Die Fragmentgrößen befinden sich im Falle von Mlu I über der Restriktionskarte, im Falle von BssH II unter derselben. Als Molekulargewichtsstandard (»M«) wurden Lambda-Concatamere aufgetragen.

(SCR4s/3'UTAs). Das 5'- (Sonde SCR1/2) und das 3'-Ende (Sonde SCR4s/3'UTAs) des HF1-Gens hybridisiert auf ein 120 kb großes Mlu I-Fragment. Es wird auf der zum zentromerischen Arm weisenden Seite von einem Fragment, das mit der HF4- und HF5-Sonde hybridisiert, flankiert.

Neben den HF1-verwandten Genen wurde der 5'-UT-Bereich des Gens für die Rezeptorphosphatase 2 (PCP-2) auf YAC C2 lokalisiert (siehe Ende dieses Kapitels und Kap. 5.2.1).

YAC B2

YAC B2 reagiert mit allen getesteten Sonden. Alle hybridisierenden Fragmente liegen am zentromerischen Arm. Man kann davon ausgehen, daß sich der chimärische Teil des Klon



YAC B2

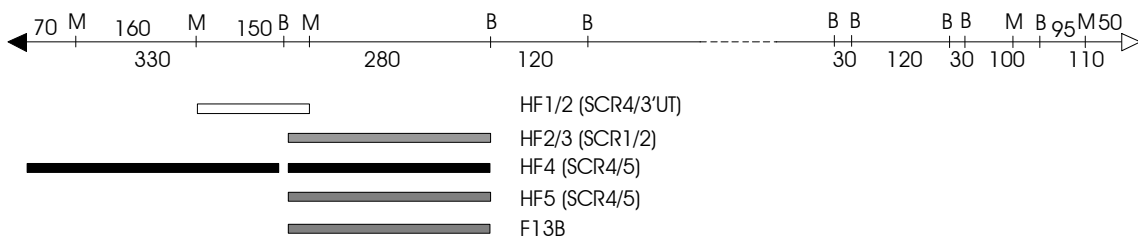


Abbildung 23: Hybridisierungsergebnisse und Restriktionskarte von YAC B2

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der vollständigen Restriktionen mit BssH II und Mlu I. Die Fragmentgrößen, an den Seiten der Abbildungen angegeben, sind in kb zu lesen.

Im unteren Teil ist die Restriktionskarte des YAC abgebildet. Unter der Karte befinden sich die Hybridisierungssignale der verschiedenen Sonden, symbolisiert durch Kästchen in unterschiedlichen Farben (Legende siehe rechte untere Ecke). Die meisten HF-Sonden sind in der Hybridisierung nicht genspezifisch. Die Gene, mit denen diese Sonden kreuzreagieren, sind in Klammern angegeben. Es wurde jeweils die kleinsten hybridisierenden Fragmente gekennzeichnet. Die Fragmentgrößen befinden sich im Falle von Mlu I über der Restriktionskarte, im Falle von BssH II unter derselben. Als Molekulargewichtsstandard (»M«) wurden Lambda-Concatamere aufgetragen.

am anderen Ende befindet, da dort auch keine Übereinstimmungen mit den anderen YAC zu finden sind.

YAC G1 wurde erst später isoliert. Da nun bekannt war, daß die meisten Sonden kreuzhybridis-

YAC G1

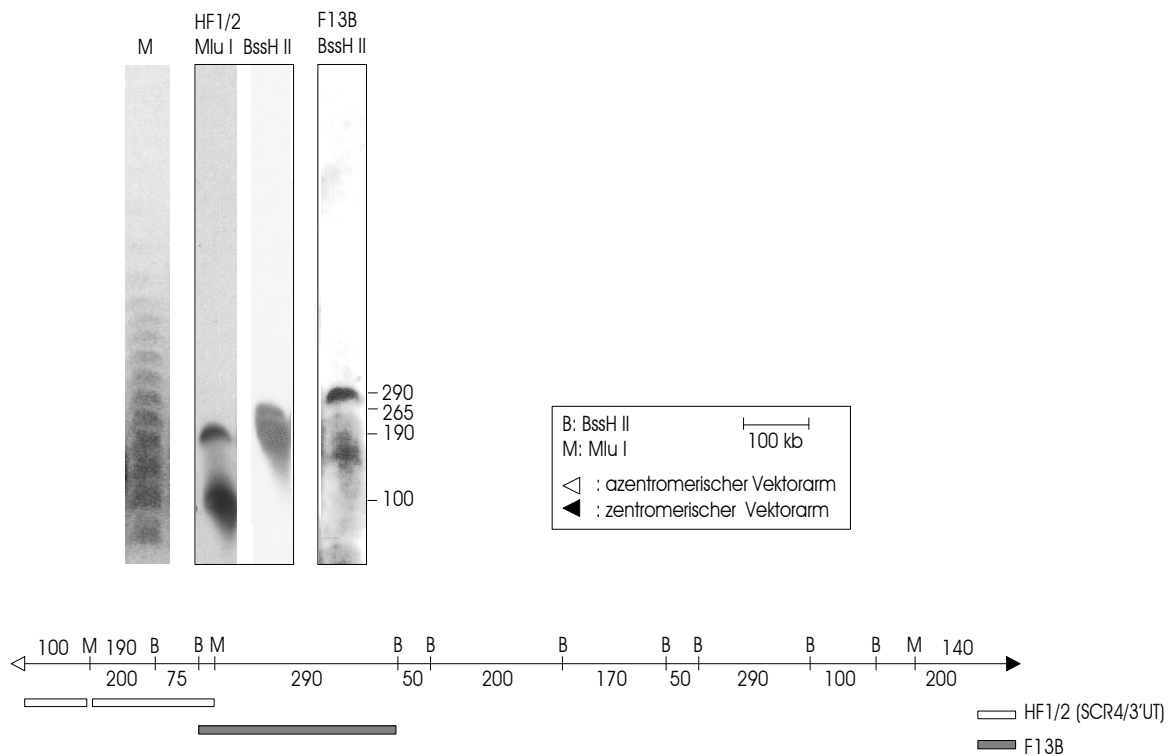


Abbildung 24: Hybridisierungsergebnisse und Restriktionskarte von YAC G1

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der vollständigen Restriktionen mit BssH II und Mlu I. Die Fragmentgrößen, an der Seite der Abbildung angegeben, sind in kb zu lesen. Im unteren Teil ist die Restriktionskarte des YAC abgebildet. Unter der Karte befinden sich die Hybridisierungssignale der verschiedenen Sonden, symbolisiert durch Kästchen in unterschiedlichen Farben (Legende siehe rechte untere Ecke). Die Fragmentgrößen befinden sich im Falle von Mlu I über der Restriktionskarte, im Falle von BssH II unter derselben. Als Molekulargewichtsstandard (»M«) wurden Lambda-Concatamere aufgetragen.

ieren und die HF-Genfamilie eng gekoppelt liegt, wurde dieser Klon nur mit zwei Sonden hybridisiert: mit der F13B detektierenden und mit einer Sonde, die mit HF1 und 2 reagiert (SCR4s/3'UTas). Die F13B-Sonde reagiert mit einem 290 kb BssH II-Fragment, das man ebenso bei den anderen F13B-positiven YAC findet. Die HF-positiven Fragmente liegen alle am acentromerischen Arm. Fragmente vergleichbarer Größe erhielt man auch bei YAC A8. Die Hybridisierungsergebnisse zeigen, daß alle bisher entdeckten Faktor H verwandten Gene und HF1 selbst relativ eng gekoppelt liegen. Das Gen kodierend für F13B, das in früheren

Studien in die Nähe von HF1 lokalisiert worden war, wurde ebenfalls auf den YAC liegend gefunden. In der folgende Abbildung sind die Hybridisierungsergebnisse und die Restriktionskarten der nicht-chimärischen YAC A8, C2 und F9 und des chimärischen YAC B2 aufgeführt. Vergleicht man die Restriktionskarten und Hybridisierungsdaten der YAC, liegt ein Überlappen mancher Klone nahe. YAC F9 überlappt vollständig mit YAC A8, ist jedoch an beiden Enden kürzer als A8. YAC F9 fehlt das HF1-Gen, was aufgrund der PCR-Ergebnisse schon ersichtlich war. Mit diesen zwei YAC überlappt auch der Klon G1. Er ist an beiden Seiten länger als A8. Die Klone C2 und B2 können nicht mit den drei überlappenden Klonen zur Deckung gebracht werden. Sie überlappen jedoch an je einem Ende miteinander.

In der folgenden Abbildung sind die fünf YAC mit den abgeleiteten Genlokalisierungen dargestellt. Die von den 2 YAC-Contigs, A8, F9 und G1 bzw. C2 und B2, überspannte genomische Region ist ca. 1,5 bzw. 1,4 Mb groß.

Die Faktor H-Genfamilie einschließlich dem Gen für F13B, erstreckt sich über 450 kb, wobei HF1 100-120 kb groß ist. Durch die Überlappung der YAC A8, F9 und G1 konnte folgende Genanordnung postuliert werden: HF1 mit seiner Transkriptionsrichtung, daran anschließend HF4 und HF2, und in nicht aufgeklärter Reihenfolge die Gene HF3, HF5 und F13B. Die YAC C2 und B2 überlappen ebenfalls. B2 enthält die Gene HF1, HF5, HF3 und F13B, C2 die Gene PCP-2 (siehe unten), HF1 und HF5.

Beim Versuch das Signalpeptid-kodierende Exon der HF2-Gens mit PCR zu amplifizieren erhielt man bei YAC C2 als Ausgangs-DNS ein Amplifikat abweichender Größe (siehe auch Kap. 5.2.1). Es wurde sequenziert und bei der Datenbanksuche erhielt man Identität zum 5'-UT des Gens für die Rezeptorphosphatase 2 (PCP-2). Der Sequenzvergleich befindet sich im Anhang. Das PCR-Amplifikat wurde mit DIG markiert als Sonde eingesetzt (siehe Abbildung 22). PCP-2 wurde bereits vorher durch FISH in die Nähe von HF1 auf Chromosom 1q32 kartiert wurde (Wang, H. et al., 1996). Unsere Ergebnisse lokalisieren den 5'-UT dieses Gens in die Nähe des 5'-Endes von HF1 auf YAC C2.

Die Fragmentgrößen, die mit gleichen Sonden hybridisieren, variieren zwischen den verschiedenen YAC geringfügig, was darauf zurückzuführen ist, daß die PF-Gele nie identisch laufen und sich deshalb Schwankungen bei der Größenbestimmung ergeben. In der von den YAC abgeleiteten Genkarte wurden die Größenunterschiede gemittelt. Durch Restriktionskartierung von BAC-Klonen soll weitere Information über die Organisation und Orientierung der Gene der Faktor H-Familie erhalten werden.

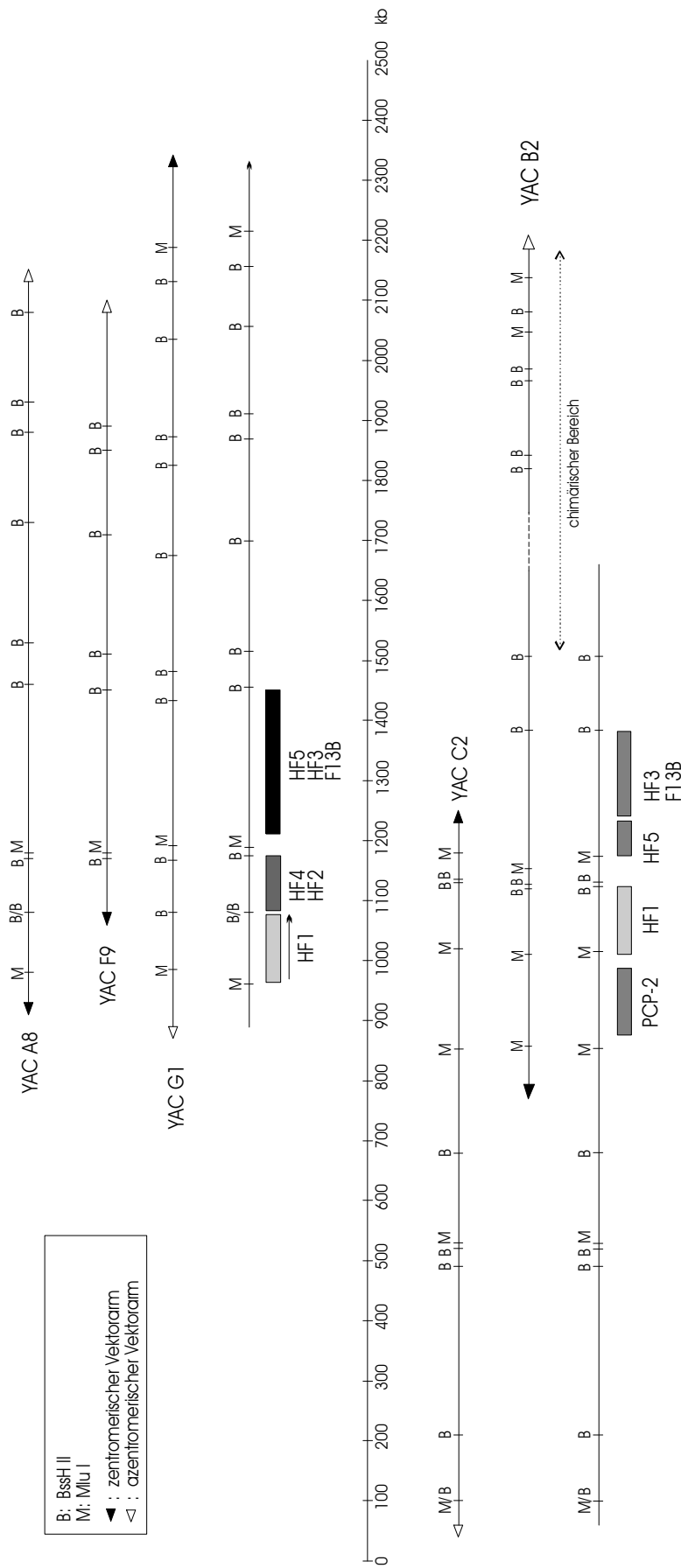


Abbildung 25: Restriktionskarten und abgeleitete Genlokalisierungen der vier nicht-chimärischen YAC A8, F9, C2 und G1 und des chimärischen YAC B2.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Restriktionskarten der drei analysierten YAC A8, F9 und G1 in eine überlappenden Gruppe und darunter die zwei Klone B2 und C2 als weitere überlappende Gruppe. Die Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Die genomische Insertion ist durch eine Linie dargestellt, die YAC-Vektorarme durch Dreiecke an den Enden der Insertion. Die Restriktionskarten der YAC sind in einer Genkarte der von ihnen überspannten Region zusammengefasst. Die darauf lokalisierten Gene sind durch farbige Kästchen dargestellt. Die Transkriptionsrichtung von HF1 ist mit einem Pfeil angegeben, wobei die Pfeilspitze in Richtung 3'-Ende des Gens weist.

5.1.4 ANALYSE DER FAKTOR H-BAC

Wie aus den YAC-Restriktionskarten hervorgeht, ist aufgrund der Restriktionsfragmente nur bedingt eine Aussage über die Orientierung der Gene und deren Anordnung möglich. Zur Überwindung dieses Problems wurden humane BAC-Klone gesucht und mittels PCR und Restriktionskartierung analysiert. Die BAC-Klone wurden über PCR mit einem Oligonukleotidpaar, das die 3'-Enden von HF1, HF2 und HF3 amplifiziert (SCR4s/3'UTas) und einem Oligonukleotidpaar, daß HF4 und HF5 (HF4 SCR4s/5as) amplifiziert, aus der humanen BAC-Bibliothek von Research Genetics isoliert (Kap. 4.2.4 und 4.2.5) und wie in den folgenden Kapiteln beschrieben analysiert.

5.1.4.1 PCR-ERGEBNISSE

Die vier erhaltenen BAC wurden zuerst mit PCR untersucht. Es wurden die in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotidpaare eingesetzt. Die PCR-Bedingungen befinden sich in Kap. 3.6.

Gene/Oligonukleotidpaare	BAC A8	BAC B20	BAC M12	BAC P20
HF1/4: SCR6s/7as HFx	600 bp -	- 900 bp	600 bp -	600 bp -
HF1: SCR10s/11as HFx	-	- 1600 bp	1500 bp -	1500 bp -
HF1: SCR14s/16as	-	-	3700 bp	3700 bp
HF1: SCR15s/16as	-	-	3200 bp	3200 bp
HF1: SCR16s/17as	-	-	1300 bp	1300 bp
HF1/2: SCR4s/3'UTas HF3	1400 bp -	- 1300 bp	1400 bp -	1400 bp -
HF2/3: SCR1s/2as	1400 bp	1400 bp	-	1400 bp
HF2: SCR2s/3 intron as	1400 bp	-	-	1400 bp
HF4: HF4 4s/HF4 5as HF5	3500 bp -	- 3100 bp	3500 bp -	3500 bp -
HF5: HF4 4s/HF5 5as	-	3100 bp	-	-
F13B:C/D	-	200 bp	-	-

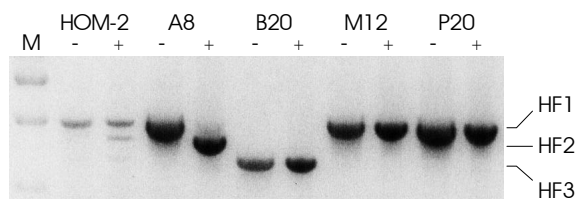
Tabelle 5: In der ersten Spalte sind die verwendeten Oligonukleotidpaare aufgelistet (Sequenzen und PCR-Bedingungen siehe im Kap. 3.6). Die vier weiteren Spalten beinhalten die Amplifikatgrößen der mit PCR untersuchten BAC-Klone. Sind zwei Größen, z.B. bei HF4, in einer Spalte angegeben, wurden zwei unterschiedlich große

Amplifikate in der PCR-Reaktion erzeugt. Bei BAC B20 traten bei zwei Oligonukleotidpaaren (HF1/4 SCR6s/7as und HF1 SCR10s/11as) Amplifikate mit einer von HF1 abweichenden Größe auf. Sie sind mit HFx markiert und könnten von einem bisher nicht beschriebenen HF-Gen stammen (siehe Kap. 5.1.4.4). »-« steht für fehlendes PCR-Produkt, d.h. der zu amplifizierende Genabschnitt befand sich nicht auf dem BAC.

Die Ergebnisse der PCR ermöglichen eine grobe Charakterisierung der BAC-Klone hinsichtlich der Gene bzw. Genabschnitte, die sie enthalten. BAC A8 zeigt HF2- und HF4-spezifische PCR-Amplifikate. HF1 ist nur mit dem Oligonukleotidpaar SCR6s/7as nachweisbar, das jedoch in Abwesenheit von HF1 auch HF4-Sequenzen amplifiziert. In diesem Fall ist also eine Sequenzierung des PCR-Produkts notwendig.

Der BAC-Klon B20 weicht in Bezug auf Amplifikatgrößen und Gengehalt von den drei anderen Klonen ab. Er enthält Teile des Gen für F13B und ist positiv mit HF3- und HF5-spezifischen Oligonukleotiden. Die Klone M12 und P20 stimmen überein in den HF1- und HF4-spezifischen Amplifikaten, man kann annehmen, daß beide diese Gene oder Teile von ihnen tragen und überlappen. P20 ist zusätzlich positiv mit HF2-spezifischen Oligonukleotidpaaren. Ihm fehlt jedoch die HF2-Bande im Pvu II-Verdau des PCR-Amplifikates SCR4s/3'UTas. Von HF2 ist also

nur der 5'-Teil auf diesem BAC.



Pvu II-Restriktionsverdau der Amplifikate mit den Oligonukleotiden SCR4s/3'UTas aus den BAC-Klonen und der genomischen Kontroll-DNS. Es sind jeweils unverdautes (-) und Pvu II-verdautes (+) PCR-Amplifikat der getesteten DNS aufgetragen. In den ersten beiden Spuren befindet sich die Kontroll-DNS (humane B-LCL HOM-2), daran anschließend die getesteten BAC-DNS. An der rechten Seite der Abbildung ist die Herkunft der Bande angegeben. Das von HF1 stammende Amplifikat hat eine Größe von 1400 bp, das mit Pvu II geschnittene, von HF2 stammende Produkt, ist um 244 bp kleiner und die für HF3 spezifische Bande ist ca. 1300 bp groß.

Abbildung 26: Pvu II-Restriktionsverdaus der Amplifikate von BAC A8, B20, M12 und P20.

5.1.4.2 SEQUENZIERERGEBNISSE

Einige PCR-Produkte der BAC wurden sequenziert. Die Sequenzierreaktionen wurden zum größten Teil mit fluoreszenzmarkierten Abbruchbasen auf dem Sequenziergerät von ABI durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse stammt auch vom Sequenziergerät ALFExpress von Pharmacia, für das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet werden (Kap. 4.1.9). Die Sequenzvergleiche zwischen der HF-Sequenz und den Sequenzen, die aus den YAC stammen, befinden sich im Anhang. In der folgenden Tabelle sind die sequenzierten Bereiche mit den verwendeten Oligonukleotiden aufgeführt.

Oligonukleotidpaar (Kap. 3.6)	BAC	sequenziertes Gen	Größe des Amplifikates
SCR6s/7as (HF1 und HF4)	A8	HF4	600 bp
	B20	HF x	900 bp
	M12	HF4	600 bp
	P20	HF4	600 bp
SCR10s/11as	B20	HF x	1600 bp
SCR16s/17as (HF1)	M12	HF1	1300 bp
SCR2s/3as (HF2)	A8	HF2b	1400 bp
SCR1s/2as (HF2 und HF3)	A8	HF2	1400 bp
	P20	HF2	1400 bp
	B20	HF3	1400 bp

Tabelle 6: Hier sind die sequenzierten Amplifikate der BAC-Klone aufgeführt. Die Oligonukleotidpaare SCR6s/7as und HF2 SCR1s/2as amplifizieren HF1- und HF4- bzw. HF2- und HF3-Genabschnitte. Die Amplifikate haben die gleiche Größe, so daß eine Differenzierung nur durch Sequenzierung möglich ist. Mit den Oligonukleotiden HF2 SCR2s/3as wird das HF2-Gen amplifiziert, von dem 3 Allele (HF2a, b, c) existieren. BAC A8 trägt HF2b.

5.1.4.3 RESTRIKTIONSKARTIERUNG NACH PFGE UND RESTRIKTIONSKARTEN DER BAC

Zur Erstellung der Restriktionskarten wurden die 4 identifizierten BAC mit 4 verschiedenen Restriktionsenzymen – Xho I, Eag I, BssH II und Sal I – verdaut (Kap. 4.1.3.2). Zusätzlich wurde mit Not I restringiert, das die Insertion aus dem Vektor schneidet. Die DNS wurde mit PFGE aufgetrennt (Kap. 4.1.4.2), das Gel geblottet und der Blot mit verschiedenen Sonden nacheinander hybridisiert. Alle verwendeten Sonden sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und in den Legenden der BAC-Restriktionskarten angegeben.

Tabelle 7:

Sonde	detektierte Gene/DNS	Farbcode in Abbildungen
HF1 SCR6s/7as	HF1 und HF4	gelb
HF1 SCR6s-10as	HF1 und schwach HF4	violett
SCR4s/3'UTas	HF1, HF2 und schwach HF3	rot
HF2 SCR1s/2as	HF2 und HF3	blau
HF4 SCR4s/SCR5as	HF4 und HF5	grün
HF5 SCR4s/SCR5as	HF5 und HF4	grün
F13B C-D	F13B	orange
pBR322	Vektor pBeloBAC11	weiß

Aus den Restriktionsfragmenten und den verschiedenen Hybridisierungen wurden die Restriktionskarten der 4 analysierten BAC abgeleitet. Drei der BAC überlappen, wie aus den PCR-Ergebnissen (siehe Tabelle 6) zu erwarten und geben dadurch Anhaltspunkte für die Orientierung, der auf ihnen lokalisierten Gene. Ein BAC, B20, überlappt nicht mit den anderen drei. Die Ergebnisse der Southernblothybridisierungen und die daraus abgeleiteten Restriktionskarten der 4 BAC sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

BAC P20

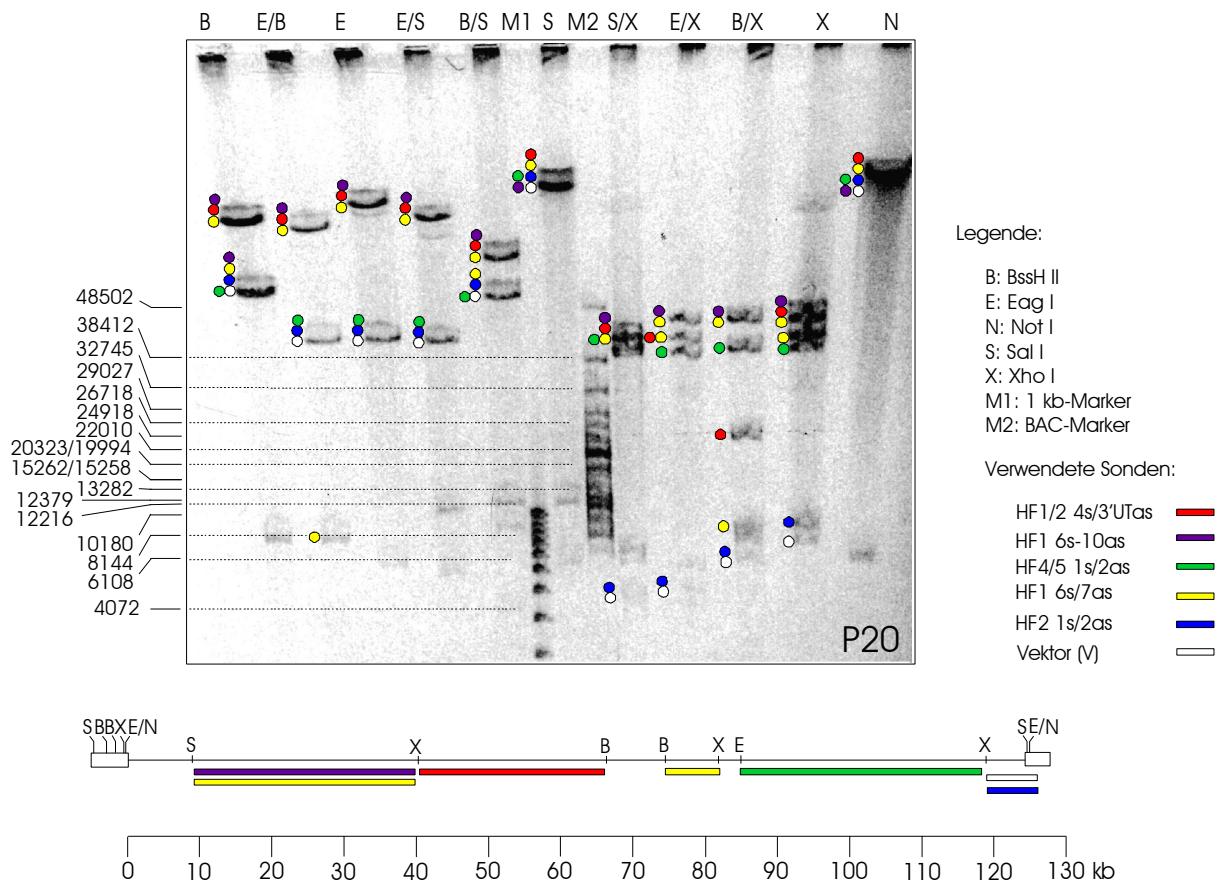


Abbildung 27: PF-Gel mit Hybridisierungsdaten und Restriktionskarte von BAC P20.

Im oberen Teil der Abbildung befindet sich das PF-Gel der verschiedenen Restriktionen des BAC A8. Die mit den verschiedenen Sonden (siehe Legende) hybridisierenden Banden sind durch farbige Punkte markiert. Unterhalb ist die von den Hybridisierungs- und Restriktionsschnittstellen abgeleitete Restriktionskarte des BAC mit einem Maßstab dargestellt. Die hybridisierenden Fragmente sind mit einem Kästchen unterlegt, dessen Farbe sich nach der verwendeten Sonde richtet. Die Erläuterungen zu Abkürzungen, Symbolen und Sonden befinden sich in der Legende am rechten Rand der Abbildung. Die Vektorenden, durch Kästchen an den Enden der genomischen Insertion dargestellt, sind nicht dem Maßstab entsprechend abgebildet und dienen nur der Darstellung der Restriktionsschnittstellen des Vektors. Bei diesem Gel erscheinen die meisten Banden als Doppelbanden. Es handelt sich dabei um ein Artefakt, das durch den Gellauf verursacht wird.

P20 ist etwas größer als 120 kb und hybridisiert mit der HF1-spezifischen Sonde SCR6-10, zusätzlich enthält er das 3'UT-Ende von HF1 (Sonde: SCR4s/3'UTas). Die Hybridisierung mit den 5'-Ende von HF1 (SCR1s/2as) war jedoch negativ, so daß man davon ausgehen kann, daß dieser BAC nicht das gesamte HF1-Gen enthält. PCR- und Sequenzierergebnisse zeigten bereits, daß P20 SCR1 und 2 von HF2 trägt. Die entsprechende Sonde reagiert mit einem kleinen Xho I-Endfragment. Zwischen den HF1-Hybridisierungen an einem Ende der Insertion und der HF2-spezifischen Hybridisierung am anderen Ende befinden sich Fragmente, die mit Sonden reagieren, die das HF4- und HF5-Gen entdecken (HF4/5 SCR4s/5as) bzw. mit den entsprechenden Sequenzen kreuzreagieren (HF1 SCR6s/7as). Nach den Sequenzierergebnissen zu urteilen, handelt es sich dabei um HF4-Gensequenzen.

BAC A8

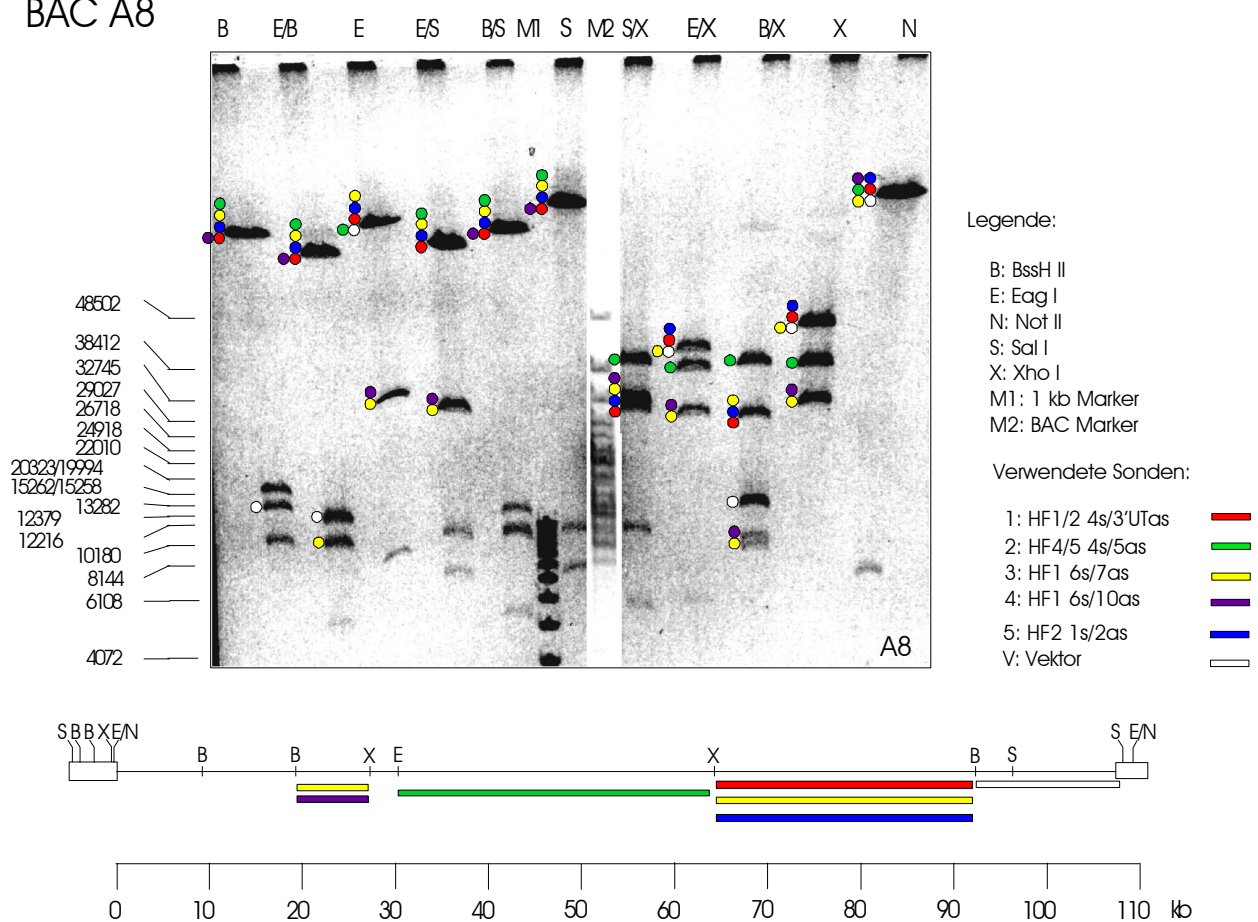


Abbildung 28: PF-Gel mit Hybridisierungsdaten und Restriktionskarte von BAC A8.

Im oberen Teil der Abbildung befindet sich das PF-Gel der verschiedenen Restriktionen des BAC A8. Die mit den verschiedenen Sonden hybridisierenden Banden sind durch farbige Punkte markiert. Unterhalb ist die von den Hybridisierungs- und Restriktionsdaten abgeleitete Restriktionskarte des BAC mit einem Maßstab dargestellt. Die hybridisierenden Fragmente sind mit einem Kästchen unterlegt, dessen Farbe sich nach der hybridisierenden Sonde richtet. Die Erläuterungen zu Abkürzungen und Sonden befinden sich in der Legende am rechten Rand. Die Vektorenden, durch Kästchen an den Enden der Insertion dargestellt, sind nicht dem Maßstab entsprechend abgebildet und dienen nur der Darstellung der im Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen.

A8, ca. 100 kb groß, überlappt mit P20, ist negativ für HF1-spezifische Sonden und positiv für die HF2- und HF4/HF5-nachweisenden Sonden. Die Fragmente, die mit HF4/HF5-Sonden hybridisieren, entsprechen den auf P20 lokalisierten Fragmenten. A8 enthält im Gegensatz zu P20 das gesamte HF2-Gen auf einem 25 kb großen Xho I/BssH II-Fragment.

BAC M12

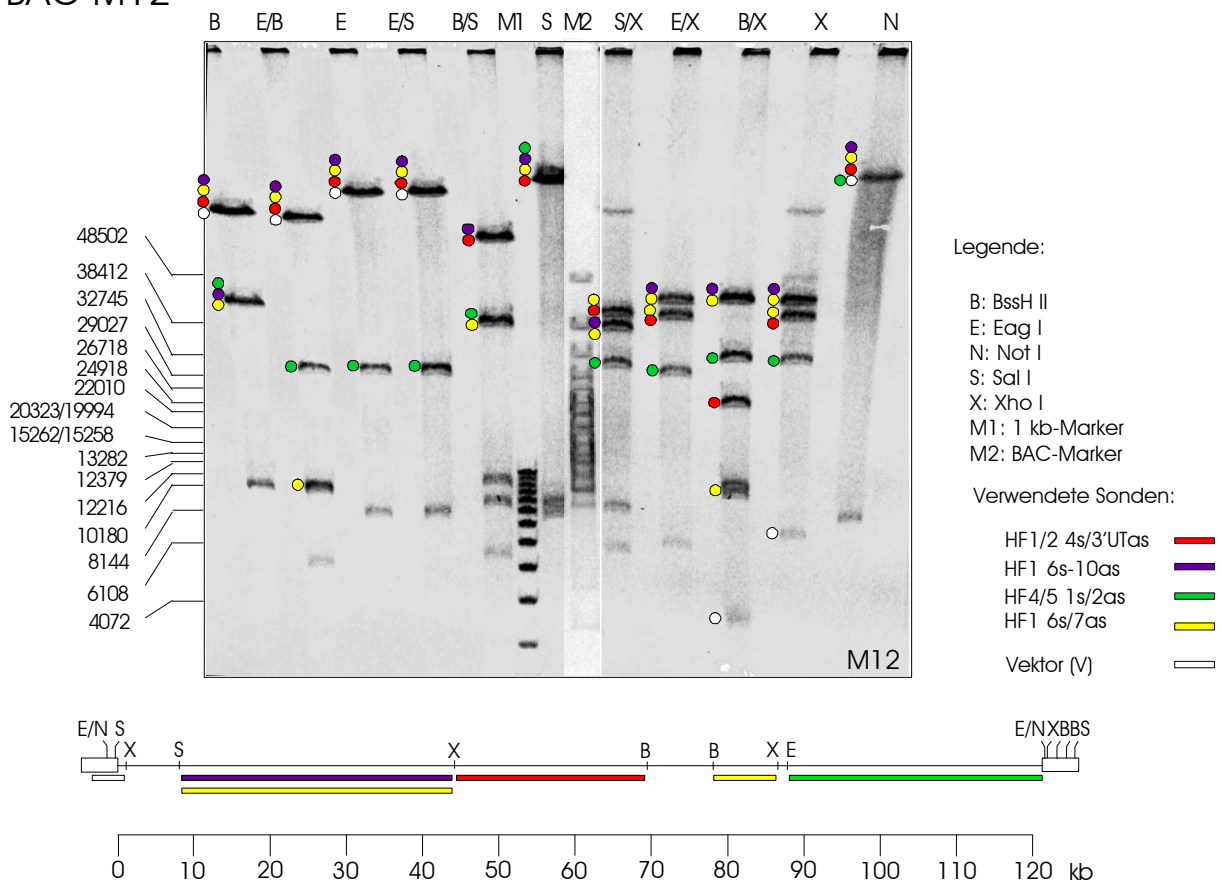


Abbildung 29: PF-Gel mit Hybridisierungsdaten und Restriktionskarte von BAC M12.

Im oberen Teil der Abbildung befindet sich das PF-Gel der verschiedenen Restriktionen des BAC M12. Die mit den verschiedenen Sonden (siehe Legende) hybridisierenden Banden sind durch farbige Punkte markiert. Unterhalb ist die von den Hybridisierungs- und Restriktionsschnittstellen abgeleitete Restriktionskarte des BAC mit einem Maßstab dargestellt. Die hybridisierenden Fragmente sind mit einem Kästchen unterlegt, dessen Farbe sich nach der verwendeten Sonde richtet. Die Erläuterungen zu Abkürzungen, Symbolen und Sonden befinden sich in der Legende am rechten Rand der Abbildung. Die Vektorenden, durch Kästchen an den Enden der genomischen Insertion dargestellt, sind nicht dem Maßstab entsprechend abgebildet und dienen nur der Darstellung der im Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen.

Der Klon M12 ist ca. 120 kb lang. Er hybridisiert mit HF1- und HF4-erkennenden Sonden. Die Restriktionsschnittstellen stimmen weitgehend mit denjenigen von P20 überein, so daß eine Überlappung der Klone angenommen werden kann. Im Gegensatz zu P20 enthält M12 keine HF2-spezifische Hybridisierung, da er an dem betreffenden Ende kürzer ist als P20.

B20 besitzt in der genomischen Insertion keine BssH II-, Eag I-, Not I- und Sal I-Schnittstellen. Es konnte nur mit Xho I kartiert werden. B20 ist ca. 150 kb groß und überlappt nicht mit BAC

BAC B20

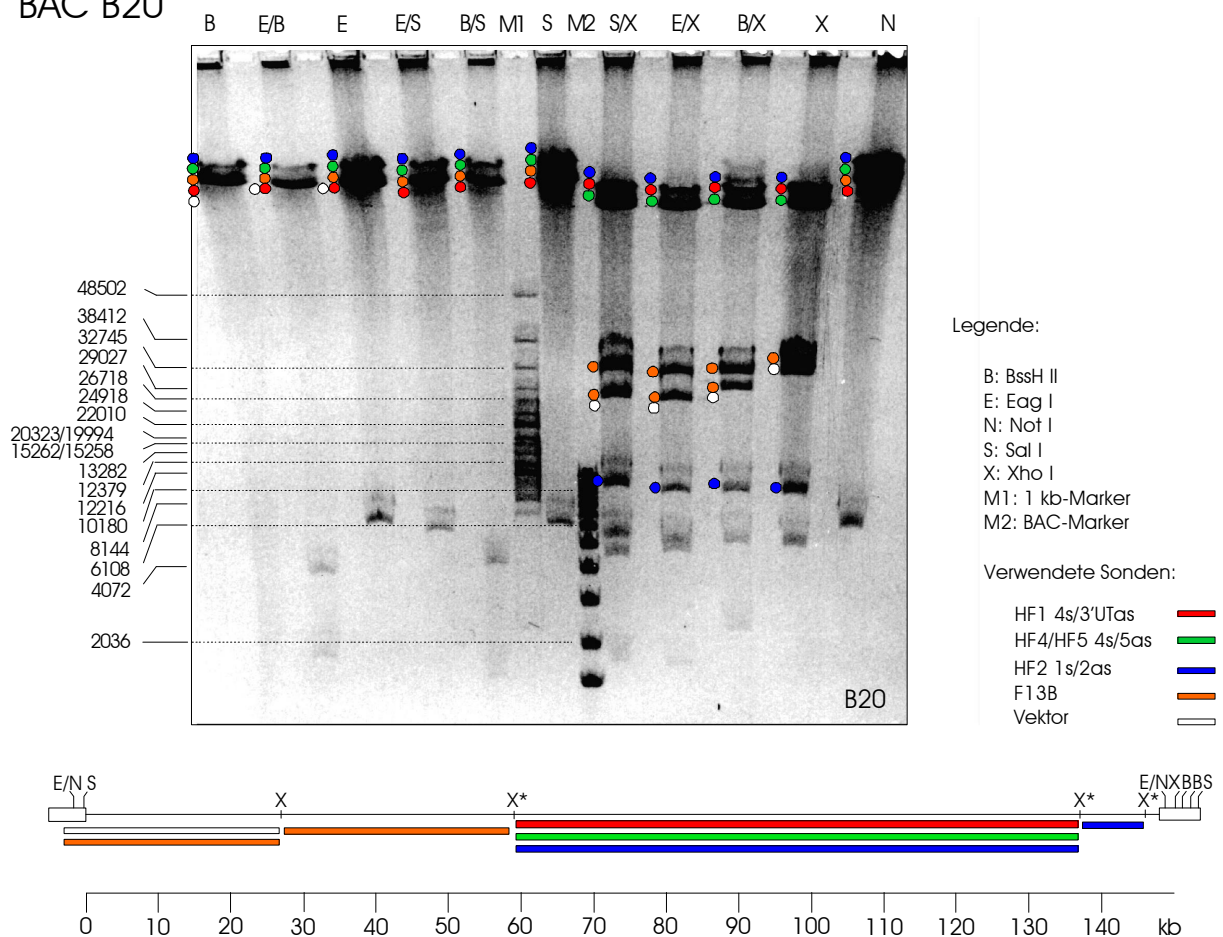


Abbildung 30: PF-Gel mit Hybridisierungsdaten und Restriktionskarte von BAC B20.

Im oberen Teil der Abbildung befindet sich das PF-Gel der verschiedenen Restriktionsverdau des BAC B20. Die mit den verschiedenen Sonden (siehe Legende) hybridisierenden Banden sind durch farbige Punkte markiert. Unterhalb ist die von den Hybridisierungs- und Restriktionsdaten abgeleitete Restriktionskarte des BAC mit einem Maßstab dargestellt. Die hybridisierenden Fragmente sind mit einem Kästchen unterlegt, dessen Farbe sich nach der verwendeten Sonde richtet. Die Erläuterungen zu Abkürzungen, Symbolen und Sonden befinden sich in der Legende am rechten Rand der Abbildung. Die Xho I-Schnittstellen, die mit einem Stern (*) markiert sind, können nicht eindeutig festgelegt werden. Die Vektorenden, durch Kästchen an den Enden der genomischen Insertion dargestellt, sind nicht dem Maßstab entsprechend abgebildet und dienen nur der Darstellung der im Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen.

A8, P20 und M12. Ein Ende der genomischen Insertion ist positiv mit der F13B-spezifischen Sonde, das andere reagiert mit der Sonde, die HF2 und HF3 entdeckt (SCR1s/2as). Aus den Sequenzierergebnissen ist bekannt, das B20 das HF3-Gen, aber nicht das HF2-Gen trägt. Das ca. 75 kb große Xho I-Fragment reagiert mit der Sonde, die das HF1/HF2-3'-Ende detektiert (SCR4s/3'UTas) und mit HF3 kreuzreagiert. Dasselbe Fragment ist außerdem positiv für die

HF4/5-spezifische Sonde (SCR4s/5as) und die HF2/HF3-entdeckende Sonde (SCR1s/2as). B20 trägt also wenigstens die Gene/Gensequenzen für F13B, HF3 und HF5 und möglicherweise noch ein HF3-verwandtes Gen/Pseudogen. Die Reihenfolge der Xho I-Restriktionsfragmente kann nicht belegt werden.

Die Einzeldaten der vier analysierten BAC kann man in einer Restriktionskarte der genomischen Region zusammenfassen. Man stellt fest, daß die BAC P20 und M12 fast vollständig überlappen. Beide sind positiv für HF1 SCR7 bis 3'UT, P20 enthält jedoch noch Teile des 5'-Teils des HF2-Gens und überlappt in diesem kleinen Bereich mit BAC A8. Dieser BAC enthält das gesamte HF2-Gen und wie die anderen zwei das Gen für HF4. Für den Klon B20 ist keine Überlappung mit den erwähnten BAC auszumachen. B20 enthält die Gene (Genabschnitte) kodierend für HF3, HF5 und F13B. Um eine genauere Genzuordnung zu erreichen, muß dieser Klon mit anderen Restriktionsenzymen verdaut werden.

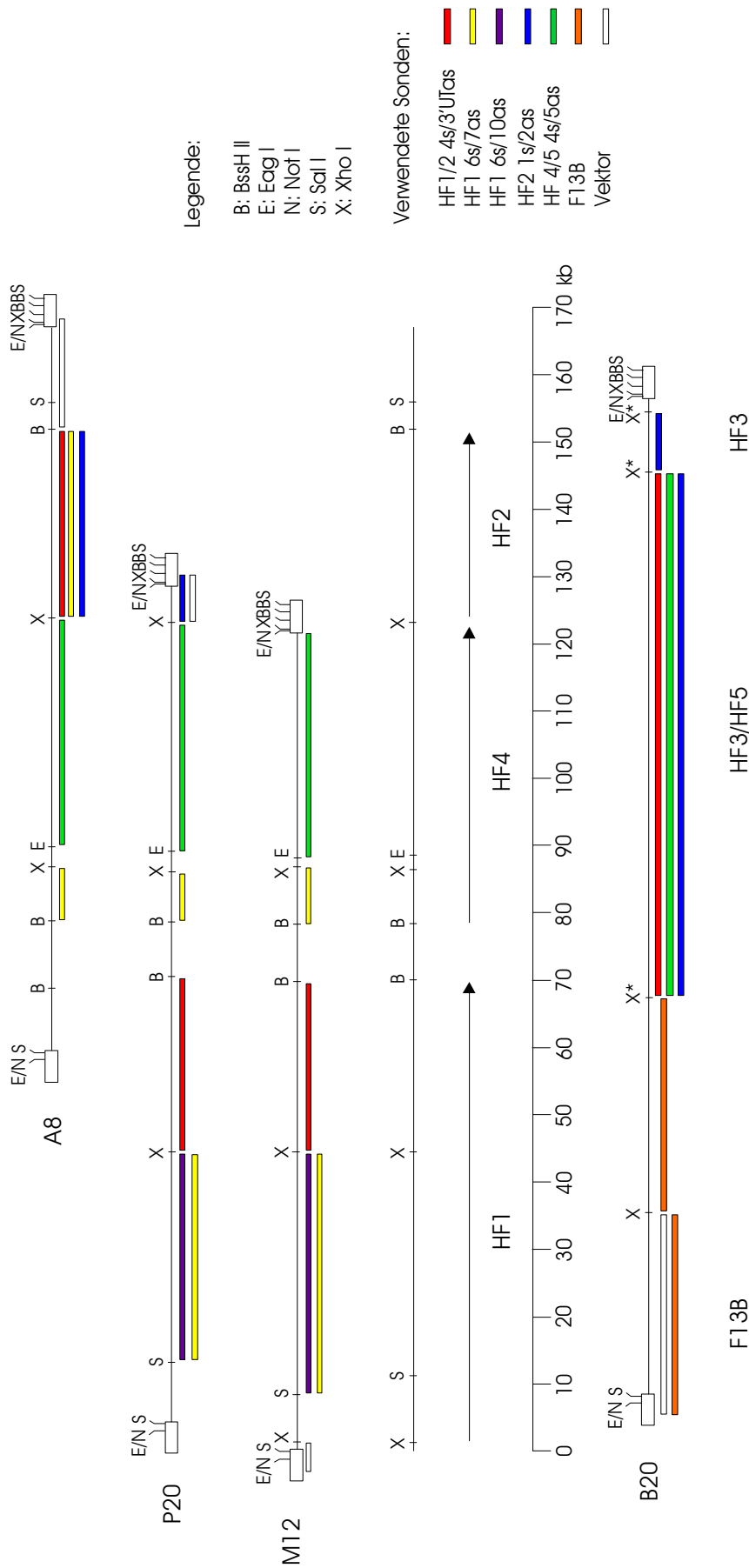
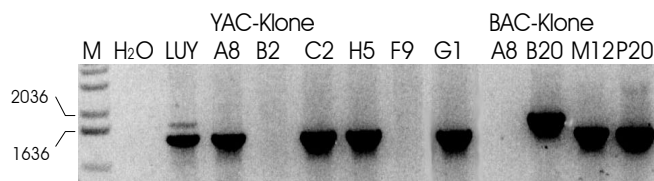


Abbildung 31: Restriktionskarten der 4 BAC mit Hybridisierungssignalen und den davon abgeleiteten Genlokalisierungen.

Die Abbildung beinhaltet die Restriktionskartierung analysierter BAC-Klone: es wurden die Restriktionsenzyme BssH II (B), Eag I (E), Sal I (S), und Xho I (X) verwendet. Mit Not I (N) wurde die Insertion des Vektors geschnitten. Die Vektorenden der BAC sind nicht maßstabgetreu an den Enden der genomischen Insertion (Linie) als Kästchen dargestellt. Die hybridisierenden Restriktionsfragmente sind mit farbigen Kästchen unterlegt, deren Farben den verwendeten Sonden entsprechen (siehe Legende am rechten Rand der Abb.). Die oberen drei Klone überlappen, die abgeleitete Restriktionskarte ist darunter gezeigt. B20 überlappt nicht mit den anderen drei Klonen und befindet sich im unteren Teil der Abbildung. Die mit einem Stern (*) markierten Xho I-Schnittstellen B20 können nicht festgelegt werden.

5.1.4.4 HINWEIS AUF EIN WEITERES FAKTOR H VERWANDTES GEN

Bei der PCR-Amplifikation mit dem HF1-spezifischen Oligonukleotidpaar SCR10s/11as erhält man ein Amplifikat von 1500 bp (Kap. 5.1.4.1 Tabelle 5). BAC-Klon B20 zeigt ein PCR-Produkt HFx abweichender Größe (1600 bp, siehe Abbildung 37), das auch in der genomischen Kontroll-DNS (LUY) zu erkennen ist.



Von links nach rechts sind jeweils 10 µl der PCR aus humaner genomischer DNS (B-LCL LUY), allen YAC- und BAC-Klonen aufgetragen. Der Molekulargewichtsstandard ist mit einem »M« markiert und die relevanten Größen sind am linken Rand angegeben.

Abbildung 32: Hinweis auf ein weiteres HF1-verwandtes Gen über Amplifikation mit den Oligonukleotiden SCR10s/11as (HF1)

Da keines der bisher bekannten HF1-verwandten Gene SCR10/11-ähnliche Sequenzen enthält, und B20 negativ für alle HF1-spezifischen PCR-Amplifikationen ist, wurde vermutet, daß dieses PCR-Produkt von einem weiteren bisher unbekanntem HF1-verwandten Gen stammen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde das PCR-Produkt der Oligonukleotide SCR10s/11as von B20 in pCR2.1 subkloniert (Kap. 4.1.8) und sequenziert (Kap. 4.1.9). Die Sequenz ist im Vergleich mit der von HF1 stammenden cDNS-Sequenz dargestellt. Aus der Sequenz wurden Oligonukleotide (B20s/B20as), die das neue Gen spezifisch amplifizieren sollen, ausgesucht. PCR-Amplifikationen wurden mit genomischer DNS aus allen YAC- und BAC-Klonen (Abbildung 33) und mit Leber-cDNS (Abbildung 34) als Ziel-DNS durchgeführt. Die Gensequenz ließ sich aus den YAC A8, B2, F9 und G1 amplifizieren. YAC C2 und alle BAC außer B20 waren negativ. Die RT-PCR-Ergebnisse

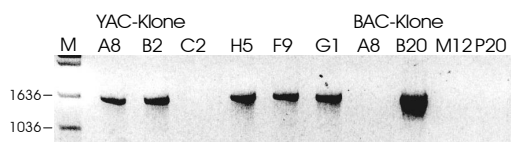


Abbildung 33: Amplifikation mit den Oligonukleotiden B20s/B20as.

Von links nach rechts sind je 10 µl der PCR aller YAC- und BAC-Klone aufgetragen. Der Molekulargewichtsstandard (»M«) befindet sich am linken Rand.

weisen darauf hin, daß das Gen in der Leber exprimiert wird. Das Oligonukleotidpaar ist außerdem spezifisch für das neue Gen. Man erhält kein Amplifikat, wenn HF1-cDNS als Ausgangs-DNS verwendet wird (Abbildung 34). Der Sequenzvergleich zwischen der HF1 cDNS und dem kodierenden Bereich des B20-Amplifikates ist in Abbildung 35 dargestellt. Die vollständige DNS-Sequenz befindet sich im Anhang.

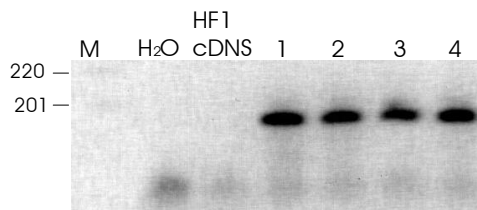


Abbildung 34: Nachweis der Expression des B20-spezifischen Amplifikates in der Leber.

In den Spuren 1-4 dienten verschiedene Leber-cDNS-Präparationen als Matrice. H₂O bezeichnet den PCR-Ansatz ohne cDNS, M den Molekulargewichtstandard. Bei HF1 cDNS wurde die klonierte cDNS in die PCR eingesetzt.

Vergleicht man die AS-Sequenzen aus HF1 SCR10 und 11 mit den entsprechenden Sequenzen aus BAC B20, so fällt auf, daß die für die SCR-Domänen typische konservierte AS Cystein erhalten bleibt. Von den 22 AS-Austauschen gehen die meisten mit einer Veränderung der Ladung einher. Vergleicht man jedoch die AS-Sequenzen aller SCR-Domänen der HF-Genfamilie miteinander, so ist die Sequenz des B20-spezifischen Amplifikates am nächsten mit HF1 10/11 verwandt.

HF1 SCR 10/11	TTT ACA ATA GTT GGA CCT AAT TCC GTT CAG TGC TAC
B20	C.. .T. .G. T.A G.C ..AA ..T ...
AS HF1	Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser Val Gln Cys Tyr
AS B20	... Ile Arg Ser Asp
HF1 SCR 10/11	CAC TTT GGA TTG TCT CCT GAC CTC CCA ATA TGT AAA
B20	..AG .G. ..A ... A.. T.TC. ..C ...
AS HF1	His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys
AS B20	Gln Trp Asn Phe ... Thr
HF1 SCR 10/11	GAG CAA GTA CAA TCA TGT GGT CCA CCT CCT GAA CTC
B20	.GAG.
AS HF1	Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu
AS B20	Gly Arg
HF1 SCR10/11	CTC AAT GGG AAT GTT AAG GAA AAA ACG AAA GAA GAA
B20	TC.T G.AG .T. .GAG ...
AS HF1	Leu Asn Gly Asn Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu
AS B20	Ser Glu Ile Arg
HF1 SCR10/11	TAT GGA CAC AGT GAA GTG GTG GAA TAT TAT TGC AAT
B20A.A G..
AS HF1	Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu Tyr Tyr Cys Asn
AS B20 Asn Asp
HF1 SCR10/11	CCT AGA TTT CTA ATG AAG GGA C
B20AT ... A.. ..A ..C ..G .
AS HF1	Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly
AS B20	... Asn ... Ile Ile Asn ...

Abbildung 35: Vergleich der Exons und der Aminosäuresequenzen für SCR10 und 11 von HF1 mit dem Amplifikat B20s/B20as aus BAC B20.

In der oberen Zeile befindet sich die cDNS-Sequenz der SCR10 und 11 von HF1, darunter die entsprechenden Exonsequenzen des Amplifikates aus BAC B20. Unter den DNS-Sequenzen sind die Aminosäuresequenzen im Dreibuchstabenkode angegeben. Sequenzübereinstimmungen sind durch Punkte markiert. Die vollständige Sequenz befindet sich im Anhang.

Es kann sich bei dem gefundenen DNS-Abschnitt um einen Teil eines weiteren HF1-verwandten Gens handeln, das in der Leber exprimiert wird.

Ein weiteres abweichendes Amplifikat erhält man mit dem Oligonukleotidpaar SCR6s/7as, das Sequenzen von HF1 und HF4 amplifiziert (siehe Tabelle 5, Kap. 5.1.4.1 und Abb. 36). Auch dieses wurde subkloniert und sequenziert (Abbildung 36).

Die DNS-Sequenz weicht besonders stark im Intron von HF1 und HF4 ab, so daß man davon ausgehen kann, daß sie von einem anderen Gen bzw. Pseudogen stammt. Die AS-Sequenz dagegen ist fast identisch zu den dargestellten Sequenzen von HF1, 4 und 5. Sie enthält jeweils nur einen AS-Austausch im Vergleich zu jedem.

Um zu überprüfen, ob sich weitere SCR-kodierende Exons in diesen PCR-Amplifikaten befinden oder die Exonverteilung dem Abschnitt des HF1-Gens entspricht, ist es notwendig, die Amplifikate vollständig zu sequenzieren.

HF1 SCR 6s	CAT TGC ACA CAA GAT GGA TGG TCG CCA GCA GTA CCA TGC CTC A
HF4 SCR 1 A.. ..GAT
HF5 SCR 1	..CGT... ..A... ..
K1 SCR 6sGT... ..A... ..
K5 SCR 6sTA ... A.G ..C
AS HF1	His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro Cys Leu
AS HF4 Asn
AS HF5 Leu ... Thr
AS K5 Thr
	Intron
HF1 SCR 6s	GTAAGTAAA-CTCTGAACTGCTATATATATGTATAAACTTTCAAAGATCGAAGAAAAG
K1 SCR 6sC.....
K5 SCR 6sC....TT..AAG--A...G..C.....GA.....GT---.G..A
HF1 SCR 6s	GAGAGCACATAAGTGATTACACCTGTCTTATGTAACAGAAATAGGGCCAAGAAAAGAGTT
K1 SCR 6s
K5 SCR 6s	.C...A...A.....-TAT.....A.....A...AGG.....
HF1 SCR 6s	GTTCAAGCAAAGTGACCAAAATAGATCTTTC-TATTATGAGGGTTCTTCTTGAAAATC
K1 SCR 6sC.....
K5 SCR 6sAA.....G.....CC.G.....ATC...G.---.....T
HF1 SCR 6s	ACAGGAGAAATAAATATAGG
K1 SCR 6s
K5 SCR 6s	...T.....G.G.C

Abbildung 36: DNS- und AS-Sequenzvergleich von HF1, HF4, HF5 und dem Amplifikat aus B20 im Bereich von HF1 SCR6 (entspricht HF4/HF5 SCR1).

In der obersten Zeile ist die Sequenz des HF1-Gens dargestellt, vom Ende des SCR6-kodierenden Exons bis ins Intron. Darunter befinden sich die cDNS Sequenzen aus den homologen SCR von HF4 und HF5. K1 ist die Konsensussequenz von 4 Kontrollklonen, K5 bezeichnet den Klon mit abweichender Größe aus BAC B20. Sequenzidentität ist durch Punkte markiert. Unter den DNS-Exonsequenzen sind die AS-Sequenzen im Dreibuchstabenkode dargestellt.

Zur weiteren Untersuchung dieser neuen HF1-verwandten Genabschnitte wurden zwei Oligonukleotide ausgewählt. Ein Oligonukleotid, das im 3'-Ende der Gene HF2-5 binden kann (SCR4 von HF3 bzw. SCR5 von HF2, 4 und 5) und möglicherweise auch im neuen Gen, wenn es homologe Sequenzen enthält (Oligonukleotidsequenzen siehe Kap. 3.6.5). Ein weiteres Oligonukleotid wurde aus dem kodierenden Bereich des B20-spezifischen Amplifikates ausgewählt. Mit PCR wurden dann Leber-cDNS und BAC B20-DNS untersucht. Die Amplifikate wurden in pCRTM 2.1 subkloniert und von beiden Seiten mit M13-Oligonukleotiden sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab neben Sequenzen, die HF1 entsprachen, auch Sequenzen, die Homologie zu HF4 bzw. HF5 zeigten, jedoch einige Austausche aufwiesen (Sequenzen siehe Anhang). Ob die vorher beschriebenen Amplifikate und die neuen Sequenzen von einem oder verschiedenen Gen/en bzw. Pseudogen/en stammen, muß noch geklärt werden.

5.2 EXPRESSION UND ORGANISATION DER GENE HF2 UND HF3

Aus früheren Untersuchungen (Estaller, 1991; Cannich, 1994) war bekannt, daß das von HF2 kodierte Protein FHRP1 bei einem kleinen Prozentsatz, ca. 4-5% der untersuchten Probanden nicht im Westernblot nachweisbar ist. Diese Prozentzahlen wurden hier in einem größeren Kollektiv bestätigt. Im untersuchten Material befand sich auch erstmals ein Proband, bei dem FHRP1 und FHRP2 nicht nachweisbar waren (siehe Kap. 5.2.1).

Hinweise, daß die fehlende Expression auf Deletionen im HF2-Gen zurückzuführen ist, gaben genomischen Southernblotanalysen.

5.2.1 GENOMISCHE ORGANISATION VON HF2 UND HF3

Die Organisation des HF2-Gens konnte weitgehend aufgeklärt werden (siehe Abb. 37). Unbekannt ist die Position des Exons, das für die Leadersequenz kodiert. Mehrfache Versuche, unter Einsatz der »long range PCR« zur Amplifikation des Bereichs zwischen dem Exon, das das Signalpeptid kodiert und Exon SCR1, ergaben nicht das gewünschte Resultat. Man erhielt drei unterschiedlich große Amplifikate mit Längen von 8000, 6000 bzw. 2000 bp, die direkt sequenziert wurden. Das 8000-bp-Produkt stammte aus einem Gen kodierend für ein Protein des humanen SNF/SWI-Komplexes (Carlson und Laurent, 1994). Das 6000-bp-Produkt enthielt die Signal-Sequenz des HF3-Gens und das 2000-bp-PCR-Amplifikat schließlich, das nur auftrat, wenn YAC C2 als Ausgangs-DNS verwendet wurde, stammte vom Gen für die Rezeptorphosphatase 2 (PCP-2). Ein HF2-spezifisches Produkt wurde nicht erhalten.

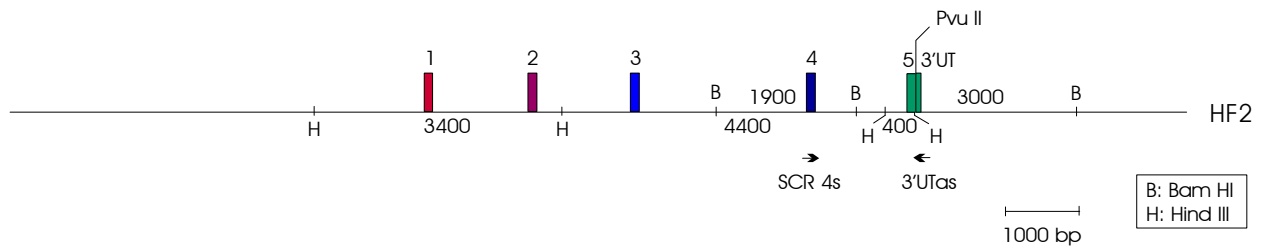


Abbildung 37: Genomische Organisation des HF2-Gens, abgeleitet durch die PCR-Ergebnisse (Tab. 1) und Restriktionskartierung von HF2-Lambda-Klonen.

Schematische Darstellung des HF2-Gens: Exonsequenzen sind durch farbige Kästchen, Intronsequenzen als Linien zwischen den Kästchen dargestellt. Die Exons sind entsprechend den von ihnen kodierten SCR-Domänen nummeriert. Die Schnittstellen und Restriktionsfragmentlängen des Restriktionsenzym Bam HI (B) sind oberhalb der Linie, die von Hind III (H) unterhalb der Linie dargestellt. Die Längen der Restriktionsfragmente sind in bp angegeben.

Die genetische Organisation der HF3-Gens wurde von Skerka et al. (1995) beschrieben. Das dort beschriebene Gen ist ca. 7 kb groß und besitzt 5 Exons (Abb. 38). Im Vergleich zur veröffentlichten HF3 cDNS enthält dieses Gen einen Aminosäureaustausch und eine 81 bp große Deletion in Exon 4.

Beim Versuch das Signalpeptid-kodierende Exon von HF2 mit PCR zu amplifizieren, erhielten wir das HF3-spezifische Exon. Der Abstand zu Exon 2 (kodiert SCR1) war jedoch nicht wie von Skerka et al. (1995) beschrieben ca. 3 kb, sondern mit 6 kb doppelt so groß. Vermutlich liegt das Signalpeptid-kodierende Exon von HF2 weiter entfernt, so daß auch mittels »Long-range«-PCR kein Amplifikat zwischen ihm und dem SCR1-kodierenden Exon erhalten wurde.

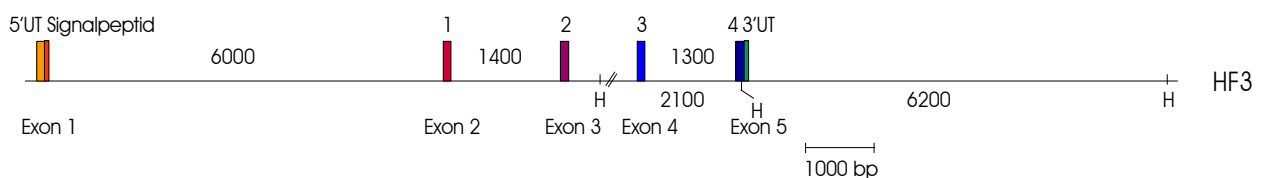


Abbildung 38: Genomische Organisation des HF3-Gens, abgeleitet durch PCR-Ergebnisse (Tab. 1) und Restriktionskartierung von HF3-Lambda-Klonen.

Schematische Darstellung des HF3-Gens: Exonsequenzen sind durch farbige Kästchen, Intronsequenzen als Linien zwischen den Kästchen dargestellt. Die Exons sind entsprechend den von ihnen kodierten SCR-Domänen nummeriert. Die Schnittstellen und Restriktionsfragmentlängen des Restriktionsenzym Hind III (H) sind unter der Linie, die Längen der PCR-Amplifikate zwischen verschiedenen Exons sind oberhalb der Linie aufgeführt. Die Längen sind in bp angegeben. Der Abstand zwischen den Exons, die für SCR2 und 3 kodieren ist nicht bekannt. Mehrfache Versuche diesen Abschnitt des HF3-Gens zu amplifizieren führten zu keinem Ergebnis.

Das von uns beschriebene HF3-Gen unterscheidet sich von dem von Skerka et al. (1995) beschriebenen Gen in der Länge von Intron 1 und trägt auch nicht die von dieser Arbeitsgruppe beschriebene 81 bp große Deletion in SCR3. Da wir bei Westernblotanalysen kein um 28 AS

(entspricht ca. 3 kDa) verkürztes HF3-Protein entdecken, könnte es sein, daß das von Skerka beschriebene Gen nicht funktionell ist.

5.2.2 WESTERNBLOTDATEN ZUR DELETION VON FHRP1 UND FHRP2

Mangel an FHRP1 und FHRP2 im Serum/Plasma kann durch SDS-PAGE, anschließenden Westernblot und Detektion der Proteine mit verschiedenen Antikörpern (siehe Kap. 4.4) entdeckt werden (siehe Abbildung 43). In dieser Untersuchung wurden gleiche Mengen (5 μ l) Serum/Plasma von Kontrollperson (Spur 1) und Patienten (Spuren 2-4) aufgetragen (Abb. 39).

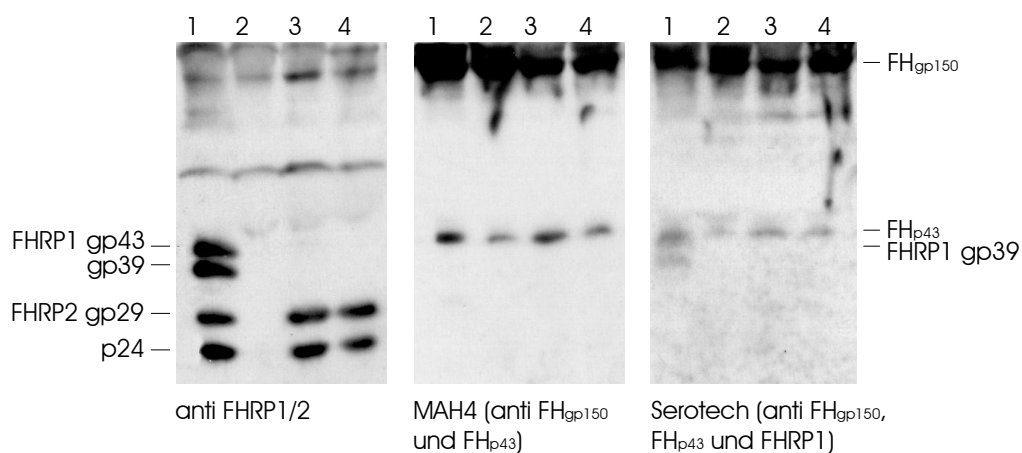


Abbildung 39: Westernblot zum Nachweis von FH_{gp150}, FH_{p43}, FHRP1 und FHRP2 in Plasma von vier verschiedenen Probanden.

In der ersten Spur jedes Blots ist Plasma einer Normalperson, anschließend die Proben drei verschiedener Probanden. Als primärer Antikörper bei der Immundetektion wurde bei ersten Blot (links) ein Kaninchenantiserum verwendet, daß gegen FHRP1 und 2 gerichtet ist. Der primäre Antikörper des zweiten Blots (Mitte) ist gegen Faktor H (FH_{gp150}) und FH_{p43}, derjenige des dritten Blots (rechts) gegen Faktor H, FH_{p43} und FHRP1 gerichtet. Die Größen der detektierten Proteine sind links und rechts in kDa angegeben. Antikörperverdünnungen und Herkunft befinden sich in Kap. 3.7.1.

Mit den verwendeten Antikörpern sind im Serum Faktor H (FH_{gp150}), das vom alternativen Spleißprodukt stammende FH_{p43} und die FH-verwandten Proteine FHRP1 und 2 in zwei Glykosylierungsformen nachweisbar. Im Kontrollserum (jeweils in Spur 1) sind die Banden der betreffenden Proteine zu sehen. In Spur 2 fehlen die FHRP1- und FHRP2-spezifischen Proteinbanden, wogegen Faktor H und FH_{p43} nachweisbar sind. Dieser Phänotyp wurde bisher noch nicht beobachtet. Häufiger, 4-5 % des untersuchten Kollektivs (siehe Kap. 5.3), trifft man dagegen das Fehlen von FHRP1 an (Spuren 3 und 4). Beide Deletionen scheinen nicht mit einem Krankheitsbild assoziiert zu sein. Ob das Fehlen der Proteine im Serum auf Gendefekte zurückzuführen ist, wurde mithilfe von Southernblotanalyse genomischer DNS der Patienten und Kontrollpersonen untersucht.

5.2.3 UNTERSUCHUNGEN ZU DELETIONEN IN DER HF-GENFAMILIE

Anlaß zur Suche nach Deletionen in der HF-Genfamilie, gaben die Befunde aus den Westernblots (Kap. 5.2.1). Bei 4-5% der Untersuchten war das von HF2 kodierte Protein FHRP1 im Westernblot nicht nachweisbar. Ein Fehlen des von HF3 kodierten Proteins wurde nur einmal in ca. 200 untersuchten Proben beobachtet (P2 in Abb. 39). Da DNS der betreffenden Personen zur Verfügung stand, wurde diese im genomischen Southernblot untersucht (Abb. 40).

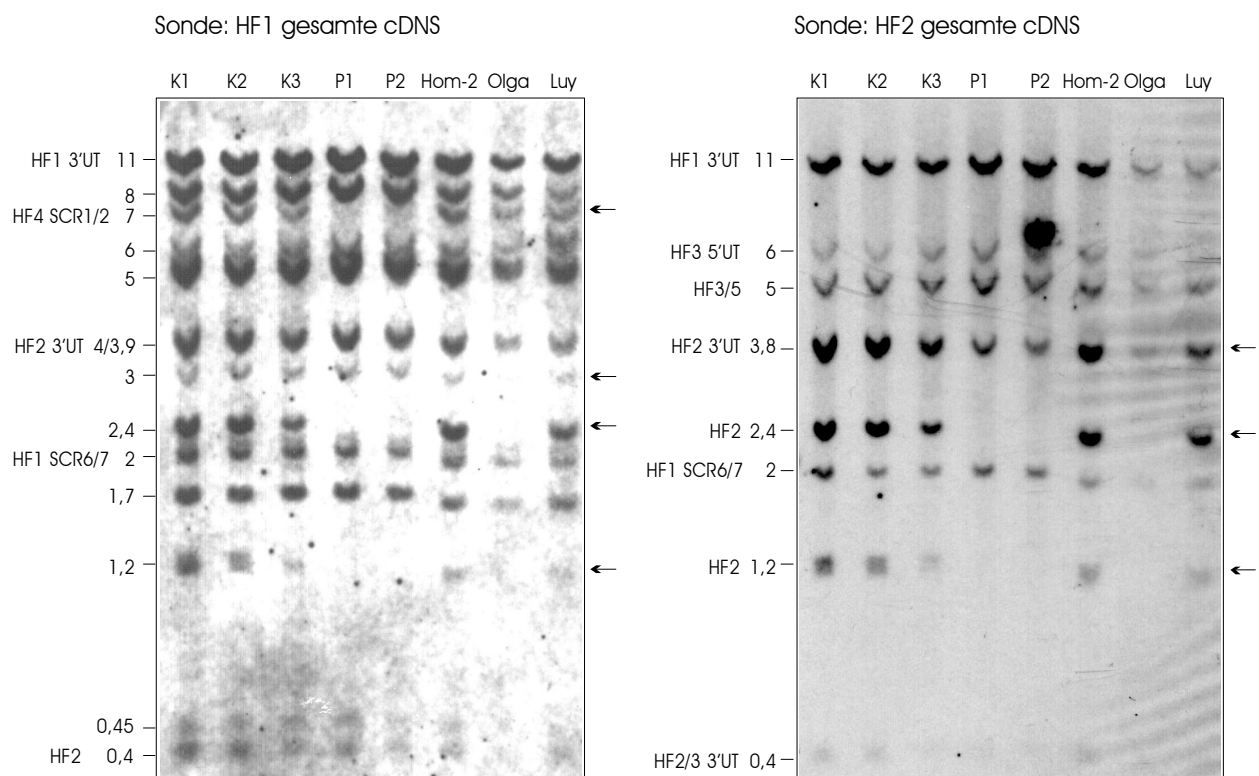


Abbildung 40: Nachweis von Deletionen in der HF-Genfamilie.

In der Abbildung befinden sich die Hybridisierungsergebnisse eines genomischen Southernblots, der mit der gesamten cDNS von HF1 (links) bzw. der gesamten cDNS von HF2 (rechts) hybridisiert wurde. 10 µg genomische DNS wurden mit Hind III restringiert und es wurde wie unter Kap. 4.1.5 beschrieben verfahren. Die Größen der Banden sind jeweils auf der linken Seite der Bilder in kb angegeben, ebenso ist dort, wenn bekannt, die Herkunft der Bande angegeben. Die DNS stammt von drei Kontrollpersonen (K1-3), die keine Deletionen in der HF-Genfamilie haben, bei Patient 1 (P1) fehlt FHRP1, bei Patient 2 (P2) fehlen FHRP1 und FHRP2 im Serum (Westernblotanalysen). Neben diesen DNS befinden sich die DNS von drei humanen B-LCL, die ebenfalls als Kontrollen dienen: HOM-2 und LUY haben keine Deletionen, wogegen Olga Deletionen im HF2-Gen trägt. Deletionen von Banden sind jeweils am rechten Rand durch Pfeile markiert.

Als Sonden zur Detektion von Deletionen in der HF-Genfamilie wurden cDNS von HF1 bzw. HF2 eingesetzt. Da HF2 und HF3 sehr ähnlich sind, kann man davon ausgehen, daß mit der HF2-Sonde auch HF3 entdeckt wird. Die HF1-Sonde dagegen hybridisiert auch mit HF4 SCR1/2 und den 3'-Genabschnitten von HF2 und HF3. Vergleicht man die Patienten (P1 und P2) mit

den Kontroll-DNS, so fällt auf, daß mehrere Banden fehlen, bzw. schwächer sind als in den Kontroll-DNS. Die Bandenmuster von P1 und P2 unterscheiden sich nicht. Die Ursache für das Fehlen des HF3-spezifischen Genprodukts FHRP2 bei P2 kann mit Southernblotanalyse nicht entdeckt werden. Es scheint keine größere Deletion für den FHRP2-Mangel bei P2 verantwortlich zu sein. Vergleicht man die Hind III-Fragmente, die aus den Restriktionsanalysen der Gene HF2 und HF3 bekannt sind (Abbildungen 37 und 38), fällt auf, daß nicht alle fehlenden Banden diesen Genen zugeordnet werden können. Vermutlich ist ein weiteres bisher unbekanntes HF1-verwandtes Gen von Deletionen betroffen.

5.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM POLYMORPHISMUS DES HF2-GENS

Das Faktor H verwandte Protein 1 (FHRP1) ist bei 4-5% der deutschen Bevölkerung nicht im Westernblot nachweisbar. Manche untersuchten Probanden tragen eine Deletion auf DNS-Ebene des HF2-Gens (Cannich, 1994). Dieser Befund, zusammen mit der kürzlich von Park et al. (1996) beschriebenen möglichen Rolle von FHRP1 bei der LPS-induzierten integrinvermittelten Neutrophilenadhäsion (siehe Kap. 1.3.2.2), veranlaßte uns die Häufigkeit der HF2-Deletion bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, unter anderem mit rheumatischer Arthritis, für die ein großes Kollektiv zur Verfügung stand, zu untersuchen.

Abbildung 41 zeigt einen Vergleich der 3'-Genabschnitte von HF1 und HF2, die für die im nächsten Kapitel erwähnten Analysen von Bedeutung sind.

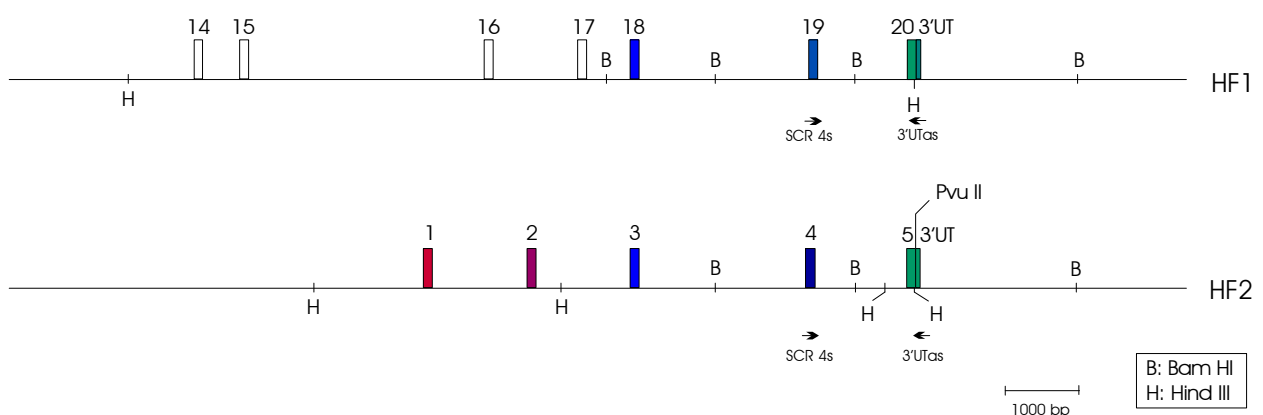


Abbildung 41: Vergleich der 3'-Genabschnitte von HF1 und HF2.

Die Exonsequenzen der Gene sind als Balken dargestellt, Intronsequenzen als Linien zwischen den Balken. Die Zahlen über den Exons beziehen sich auf die von ihnen kodierten SCR-Domänen. Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben markiert, wobei B = BamH I, H = Hind III und P = Pvu II bedeuten. Die Pvu II-Schnittstelle im SCR 5-kodierenden Exon ist charakteristisch für HF2 und ermöglicht die Unterscheidung der von HF1 bzw. HF2 stammenden PCR-Amplifikate. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind durch Pfeile unter den Exons dargestellt.

5.3.1 GRUNDLAGEN ZUM HF2-POLYMORPHISMUS

Die Untersuchung der Häufigkeit der HF2-Deletion und der Heterozygoten wurde mit PCR und anschließendem Restriktionsverdau des PCR-Amplifikates durchgeführt (siehe Abb. 42).

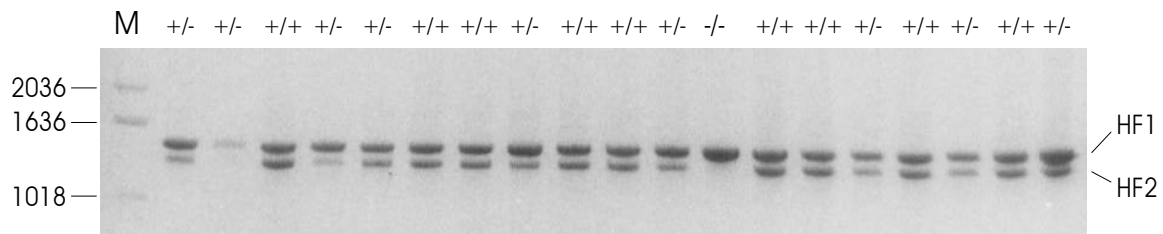


Abbildung 42: HF2-Homo-, -Heterozygote und -Nullallel

Pvu II-Restriktionsverdau des PCR-Amplifikates der Oligonukleotide HF2 SCR4s/3'UTAs von genomischer DNS 19 verschiedener Patienten mit rheumatischer Arthritis. Die Hälfte des PCR-Ansatzes wurde für 2 Stunden mit Pvu II verdaut und der gesamte Verdau auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die obere Bande stammt vom HF1-Gen, das Amplifikat wird nicht mit Pvu II geschnitten. Die untere Bande stammt vom HF2-Gen, daß eine Pvu II-Schnittstelle trägt. Das kleine Pvu II-Fragment ist auf dem Gel nicht.

M: 1-kb-Längenstandard
 +/+ : beide HF2-Gene vorhanden
 +/- : ein HF2-Gen vorhanden, eines deletiert
 -/- : Deletion beider HF2-Gene

Wenn beide Allele von HF2 vorhanden sind, erhält man zwei gleichstarke Banden: HF1 und HF2. Fehlt ein HF2-Allel, dann ist die Pvu II-restringierte Bande schwächer als das HF1-Fragment. Wenn beide HF2-Allele deletiert sind, erhält man nur die von HF1 stammende Bande. Die Genkarte in Abbildung 41 veranschaulicht, wie ähnlich die Gene HF1 und HF2 in ihrem 3'-Ende sind. Die Pvu II-Schnittstelle im SCR5-kodierenden Exon von HF2 ermöglicht die hier angewendete Methode zur Differenzierung der von HF1 und HF2 stammenden PCR-Amplifikate.

Der Unterschied zwischen Personen, die beide HF2-Allele tragen (+/+) und denen, die nur ein Allel (+/-) besitzen, ist deutlich zu erkennen, wenn man die Bandenstärken vergleicht (siehe Abbildung 41). Personen, denen beide HF2-Allele fehlen (-/-) zeigen nur das HF1-spezifische PCR-Amplifikat, welches nicht mit Pvu II geschnitten werden kann. Die restlichen Ergebnisse der Pvu II-Restriktionen von Patienten- und Kontrollpersonen-DNS sind in Tabelle 8 im nächsten Kapitel zusammengefaßt.

5.3.2 DIE HF2-DELETION IN RHEUMAPATIENTEN UND KONTROLLPERSONEN

Mit der oben beschriebenen Methoden wurden nun 112 DNS-Proben von Rheumapatienten analysiert. Zur Kontrolle wurde dieselbe Analyse mit 208 DNS-Proben von unauffälligen Kontrollpersonen durchgeführt. Die Ergebnisse beider Gruppen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

	HF2 +/+	HF2 +/-	HF2 -/-
Anzahl der Patienten	60 (53,6)	47 (42,0)	5 (4,4)
Kontrollkollektiv	108 (52,0)	91 (43,7)	9 (4,3)

Tabelle 8: HF2-Genotypen bei untersuchten Patienten und Kontrollkollektiv.

HF2 +/+: beide HF2-Allele vorhanden

HF2 +/-: ein HF2-Allel deletiert

HF2 -/-: beide HF2-Allele deletiert

Die Anzahl der Patienten bzw. Kontrollen mit den verschiedenen Genotypen ist in jeder Spalte aufgeführt. In Klammern befinden sich die Angaben in Prozent.

Von 112 getesteten Patienten trugen 53,6% beide HF2-Allele, 42% fehlte ein HF2-Allel und 4,4% fehlten beide HF2-Allele. Von 208 getesteten Personen trugen 52% beide HF2-Allele, 43,7% fehlte eines der HF2-Allele und bei 4,3% waren beide Allele deletiert. Diese Zahlen entsprechen den in vorherigen Untersuchungen ermittelten Werten bei unterschiedlichen Patienten (PBC, MS) und Normalpersonen (PBC-Patienten siehe Estaller, 1994) die mit Hilfe einer anderen Methode (Southernblothybridisierung genomischer DNS) ermittelt wurden.

Aus den Zahlen wird deutlich, daß kein Zusammenhang zwischen der Deletion bzw. Heterozygotie für des HF2-Gen und rheumatischer Arthritis besteht, da die Frequenzen für Normalpersonen und Patienten nahezu gleich sind. Es handelt sich bei der Deletion möglicherweise um einen unauffälligen Polymorphismus, der unabhängig von untersuchten Kollektiv mit einer Homozygotie-Häufigkeit von 4-5% in der deutschen Bevölkerung auftritt. Dieser Polymorphismus, mit einer Allelfrequenz von 25,4%, kann jedoch als genetischer Marker für diese Region dienen.

5.4 EXPRESSION DER HF-GENFAMILIE IM GEHIRN UND IN GLIOMAZELLINIEN

Die meisten Komplementproteine und Regulatoren werden direkt im Gehirn gebildet. Auch die Synthese von Faktor H wurde bereits nachgewiesen, wogegen unbekannt ist, ob auch die Faktor H verwandten Proteine im Gehirn exprimiert werden. Wir untersuchten deshalb die Expression von HF1 und der HF1- verwandten Gene HF2 -5 mittels Northernblotanalyse und

RT-PCR an verschiedenen Hirnarealen und Gliomazelllinien. Das Vorhandensein der Proteine FH, FHRP1 und 2 wurde im Liquor verschiedener Patienten im Westernblot nachgewiesen.

5.4.1 WESTERNBLOTANALYSEN ZUM NACHWEIS VON FAKTOR H, FHRP1 UND FHRP2 IN LIQUOR

Für die Detektion von Faktor H und FHRP in Liquormaterial analysierten wir Liquor- und Serumproben von 5 verschiedenen Patienten (freundlicherweise von Prof. Hohlfeld, Neuroimmunologie der LMU, zur Verfügung gestellt). Die Proben – je 2 μ l Serum bzw. 10 μ l Liquor – wurden wie unter Kap. 4.4 beschrieben auf einem SDS-PA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel über Nacht auf Nitrozellulosemembran geblottet und diese anschließend mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe Kap. 4.4.3).

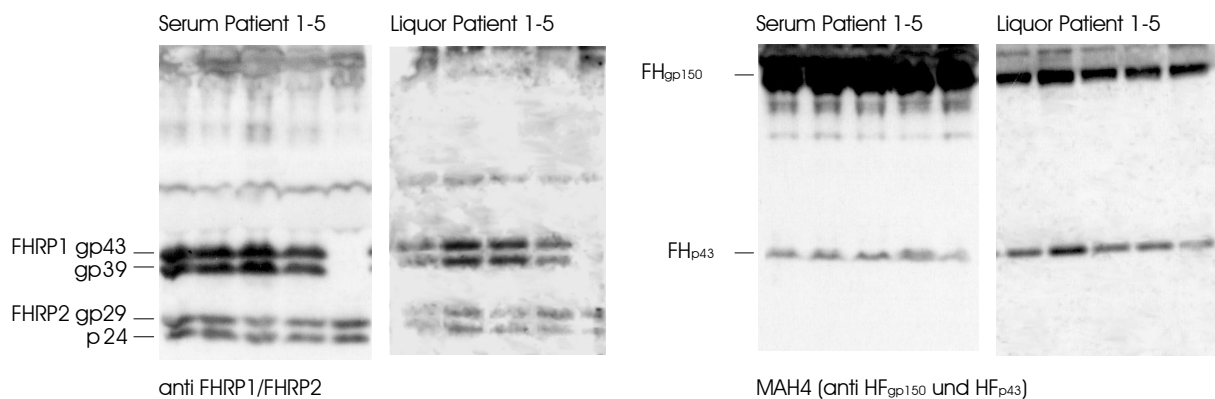


Abbildung 43: Nachweis von Faktor H und FHRP1 und 2 in Liquor und Serum.

Nebeneinander sind Serum und Liquor 5 verschiedener Patienten aufgeführt: auf der linken Seite sind die Westernblots abgebildet, die mit einem gegen FHRP1 und FHRP2 gerichteten Antikörper entwickelt wurden. Rechts befinden sich die Westernblots, die mit einem Antikörper gegen Faktor H (FH_{gp150}) und das verkürzte FH_{p43} inkubiert wurden (Antikörper und Antikörperverdünungen siehe Kap. 3.7). An den linken Seiten sind die jeweiligen Proteinennamen und ihre Größen angegeben.

Alle untersuchten Serumproteine: Faktor H (FH_{gp150}), die verkürzte Form von Faktor H (FH_{p43}), FHRP1 und FHRP2 in ihren unterschiedlich glykosylierten Formen sind, wenn auch in geringerer Menge als im Serum im Liquor der Patienten nachweisbar. Bei Patient 5 fehlt FHRP1, er gehört zu der Gruppe der 4-5% der Bevölkerung, bei der FHRP1 aufgrund einer Gendeletion nicht nachweisbar ist (siehe Kap. 5.2 und 5.3). Weiterhin wurde beobachtet, daß im Liquor, gemessen an der Menge von Faktor H mehr FH_{p43} vorhanden ist als im Serum (Abb. 43). Die Menge an FH_{p43} liegt im Serum bei 10-50 μ g/ml, ist also 10-50 mal geringer als die Menge an Faktor H (Zipfel und Skerka, 1999). Im Liquor dagegen scheint die Menge an FH_{p43} dagegen nur 2-5 mal weniger als die für Faktor H. Die Ergebnisse der Westernblots mit Liquorproben veranlaßten uns zu untersuchen, ob Faktor H und FH_{p43} und die im Liquor entdeckten Moleküle FHRP1

und 2 von Zellen im Gehirn selbst produziert werden oder aus dem Serum stammen. Außerdem sollte die Transkriptmenge von FH_{p43} untersucht werden. Dazu wurden Northernblots und RT-PCR mit RNS bzw. cDNS isoliert aus Gewebe unterschiedlicher Hirnareale und aus Gliomazelllinien durchgeführt.

5.4.2 NORTHERNBLOTANALYSEN ZUM NACHWEIS DER HF-GENFAMILIE IN HIRNGEWEBEN UND GLIOMAZELLINIEN

In nichtpathologischen Zuständen wird ein Übertritt von Serumproteinen durch die Blut-Hirn-Schranke verhindert. Da jedoch das Material von neurologisch auffälligen Personen, zum Teil mit Verdacht auf Multiple Sklerose, stammte, kann man nicht unbedingt von einer intakten Blut-Hirn-Schranke ausgehen. Das Gehirn ist andererseits zur Synthese fast aller Komplementproteine fähig, und auch Faktor H wurde bereits nachgewiesen. Die meisten dieser Untersuchungen wurden allerdings an Zelllinien und nicht an Gewebe durchgeführt. Unsere Untersuchungen sollten also Aufschluß über eine eventuelle Transkription der Gene HF1- 5 im Gehirn und in den Gliomazelllinien geben. Das untersuchte Gehirnmateriale erhielten wir freundlicherweise von Prof. Mehraïn, Neuropathologie, und aus dem Institut für Immunologie der LMU, das auch die Gliomazelllinien N59 und N63 bereitstellte. Die Gliomazelllinie T98G und die epitheliale Ewing-Sarkomazelllinie SK-ES-1 wurden von ATCC erworben. Die Gliomazelllinien N59 und N63 sind im Vergleich zu T98G, die von vielen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Komplementexpression verwendet wird, nicht sehr gut charakterisiert. RNS wurde aus den verschiedenen Gehirngeweben und Zelllinien wie unter Kap. 4.3 beschrieben isoliert und auf einem denaturierenden Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde Leber-RNS aufgetragen, da in der Leber HF1 und alle verwandten Gene transkribiert werden. Die RNS wurde über Nacht auf Hybond N+ geblottet, mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert und anschließend immundetektiert (siehe Kap.4.1.5).

Bei dem in Abbildung 44 gezeigten Blot wurde SCR1-7 aus der HF1-cDNS als Sonde verwendet. Diese Sonde hybridisiert mit den 4,3 kb und 1,8 kb HF1-Transkripten. In den Spuren der verschiedenen Gehirngewebe sind nach 12 Stunden Exposition keine Signale sichtbar. Nach längerer Exposition sind im Plexus chorioideus schwache Signale sichtbar (nicht gezeigt). Die Gliomazelllinien T98G und N59 exprimieren die beiden von HF1 stammenden Transkripte im unstimulierten Zustand etwas stärker, diese Signale sind jedoch zu schwach um deutlich im gescannten Bild zu erscheinen. Bei beiden Zelllinien steigt die Transkriptmenge nach IFN γ -Stimulation an. T98G produziert nach Stimulation mehr verkürzte HF1-Transkripte (1,8 kb), während bei N59 die 4,3 kb HF1-Transkripte überwiegen.

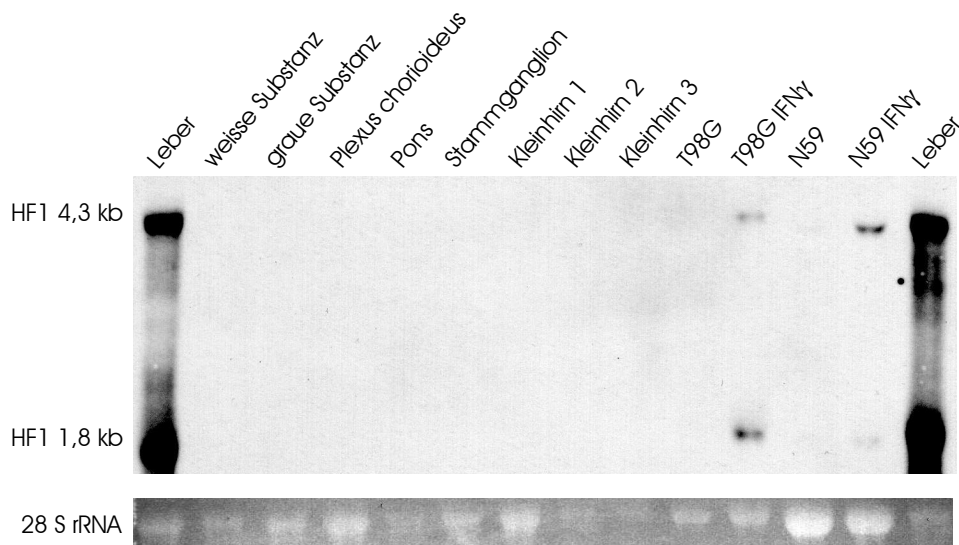


Abbildung 44: Northernblotanalyse zum Nachweis von 4,3 kb und 1,8 kb HF1-Transkripten in verschiedenen Gehirngeweben, unstimulierten und IFN γ -stimulierten Gliomazelllinien.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der Positivkontrolle Leber-RNS, der RNS aus verschiedenen Gehirngeweben und der Proben der Gliomazelllinien T98G und N59 in unstimuliertem Zustand und IFN γ behandelt. Die Expositionszeit betrug 12 h. Die Hybridisierungssignale der HF1 4,3 kb und der 1,8 kb mRNS sind an der Positivkontrolle markiert. Im unteren Teil der Abbildung ist der relevante Ausschnitt des Northernblots gezeigt. Es wurden pro Spur 5 μ g Gesamt-RNS aufgetragen.

Bei dem Abbildung 45 gezeigten Blot wurde das Amplifikat SCR4s/3'UTAs aus der cDNS von HF2, das die 3'-Enden von HF1 und HF2 erkennt, als Sonde eingesetzt. Hier ist nur der Northernblot der unterschiedlich stimulierten Gliomazelllinien gezeigt, da bei den Hirngeweben keine Signale sichtbar waren. Deutliche Hybridisierungssignale sieht man, abgesehen von der Positivkontrolle Leber-RNS, in allen Spuren der Zelllinien N59 und SK-ES-1. Im Gegensatz zur Kontrolle ist nur das 4,3 kb große HF1-Transkript zu sehen, das HF2-Transkript ist nicht nachweisbar. Bei der Zelllinie T98G (IFN γ stimuliert) sieht man nach längerer Exposition ebenfalls ein Signal (nicht gezeigt). Die Stimulation mit IFN γ hat einen deutlichen Einfluß auf die Transkripte von HF1: vergleicht man die Spuren für unstimulierte und IFN γ -stimulierte N59-Zellen, sieht man in den stimulierten Zellen eine Zunahme der Transkriptmenge. Den selben Effekt kann man bei der Zelllinie T98G beobachten (Bild nicht gezeigt).

IL4 und IL6 haben keinen sichtbaren Effekt auf die Transkription von HF1 und HF2. Die Northernblotergebnisse zeigen, daß HF1 und HF2 in den unterschiedlichen Hirnarealen in einer mit dieser Methode nicht nachweisbaren Menge oder überhaupt nicht transkribiert wird. In Gliomazelllinien dagegen sind die Transkripte von HF1, besonders nach Stimulation mit IFN γ , nicht jedoch von HF2 nachweisbar.

5.4.3 RT-PCR ANALYSEN ZUR UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DER HF-GENFAMILIE IN HIRNGEWEBE

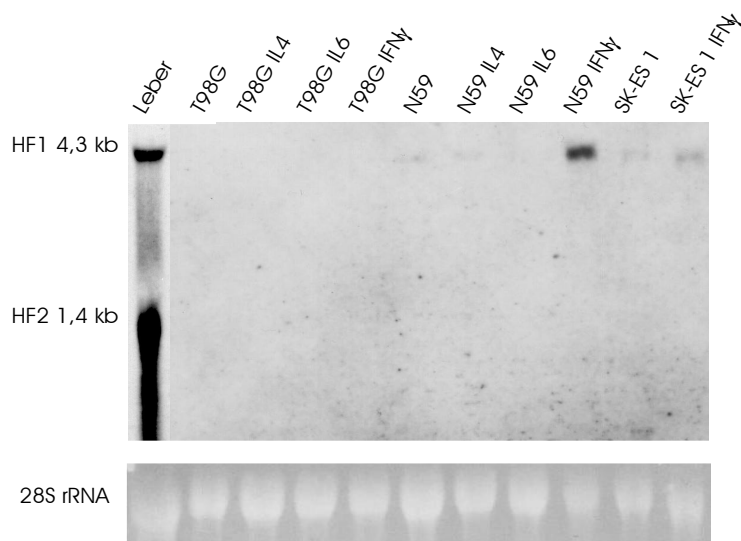


Abbildung 45: Northernblotanalyse zum Nachweis von HF1- und HF2-Transkripten in unterschiedlich stimulierten Gliomazelllinien.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Hybridisierungssignale der Positivkontrolle Leber-RNS die Signale der Proben der Gliomazelllinien T98G und N59 in unstimuliertem Zustand und nach IL2-, IL4-, IL6- und IFN γ und die RNS der epithelialen Sarkomazelllinie SK-ES-1 unstimuliert und mit IFN γ behandelt. Die Expositionszeiten betragen für die Positivkontrolle 1 h, sonst 12 h. Die Hybridisierungssignale der HF1- und HF2-mRNS sind an der Positivkontrolle markiert. Im unteren Teil der Abbildung ist der relevante Ausschnitt des Northern-Gels gezeigt. Es wurden pro Spur 5 μ g Gesamt-RNS aufgetragen.

UND GLIOMAZELLINIEN

Da sich mittels Northernblotanalysen nur Transkripte des HF1-Gens, und auch die nur schwach im Material der Zelllinien nachweisen ließen, wurden weitere Untersuchungen mit der sensitiveren Methode der RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR wurde wie unter 4.3.3 beschrieben durchgeführt. Für die Amplifikationen von HF1 und HF-verbunden Genen wurden folgende Oligonukleotidpaare (siehe Abbildung 6, Kap. 5.1.1.1) eingesetzt:

Tabelle 9:

Gen	Oligonukleotidpaare
HF1	SCR4s/3'UTas
HF2	SCR4s/3'UTas, Amplifikat mit Pvu II verdaut
HF3	SCR2s/SCR4as
HF4	HF4 SCR4s/ HF4 SCR5as
HF5	HF4 SCR4s/ HF5 SCR5as

Der gesamte Amplifikationsansatz wurde auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle für die RT-PCR diente Leber cDNS. Die relevanten Gelausschnitte sind in Abbildung 46 gezeigt.

Für alle untersuchten Gene sind in der Leber (Positivkontrolle) stark Transkripte nachweisbar. In den verschiedenen Gehirnarealen und in den Gliomazelllinien werden die untersuchten Gene HF1 -5 differentiell exprimiert. HF1 wird in allen untersuchten Proben am stärksten

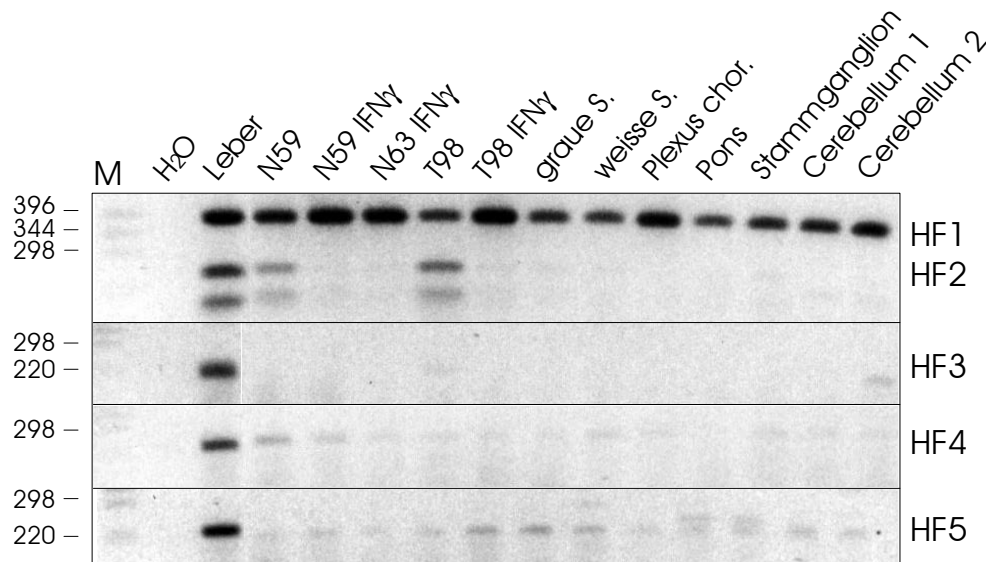


Abbildung 46: RT-PCR zum Nachweis der HF-Transkripte in Gliomazelllinien und verschiedenen Gehirngeweben.

In der Abbildung sind die relevanten Gelausschnitte der verschiedenen RT-PCR-Amplifikationen zusammengefaßt. Ganz links befindet sich der Molekulargewichtsstandard (M), die Bandengrößen sind am linken Rand in bp angegeben. Daran anschließend sind die Amplifikate folgender Proben aufgetragen: Negativkontrolle (H_2O), Positivkontrolle (Leber-cDNS), unstimulierte und $IFN\gamma$ -stimulierte Gliomazelllinie und verschiedene Gehirngewebe. Die für die Amplifikationen eingesetzten Oligonukleotidpaare sind in Tabelle 9 aufgeführt. Es wurde jeweils das gesamte Amplifikat aufgetragen.

transkribiert. $IFN\gamma$ hat einen positiven Effekt auf die Transkripte des HF1-Gens, der auch in der Northernblotanalyse nachgewiesen wurde. Auffallend ist auch die starke Expression von HF1 im Plexus chorioideus, der für die Produktion des Liquor zuständig ist.

HF2 wird relativ stark in den unstimulierten Zelllinien N59, N63 und T98G transkribiert, in den restlichen Proben ist sein Transkript kaum nachweisbar. Das HF3-Transkript ist ebenfalls kaum nachweisbar, auch nicht in den Gliomazelllinien.

HF4 und HF5-Transkripte sind in fast allen untersuchten Hirngeweben und Gliomazelllinien, wenn auch auf einem sehr geringen Niveau nachweisbar. Bei HF5 tritt bei den Proben Pons und Stammganglion eine zweite schwache Bande auf, die jedoch nicht von HF5 oder einem HF-verwandten Gen stammt.

$IFN\gamma$ hat wie bereits erwähnt einen positiven Einfluß auf die Expression von HF1 (Ripoche et al., 1988), wogegen die Expression von HF3, HF4 und HF5 nicht von $IFN\gamma$ beeinflussbar

zu sein scheint. Die HF2-spezifischen RT-PCR-Produkte sind in den stimulierten Zelllinien im Vergleich zu den IFN γ -stimulierten nur sehr schwach nachzuweisen. IFN γ hat auf die Expression von HF2 einen negativen Effekt. Auch in den Northernblotanalysen war eine Stimulation der HF1-Transkripte in allen Gliomazelllinien nach IFN γ -Behandlung nachweisbar. Dieses Zytokin verstärkt jedoch nicht die mRNS-Menge der anderen HF-Gene. Interessanterweise können aus den stimulierten Gliomazelllinien kaum HF2-Transkripte amplifiziert werden.

6 DISKUSSION

6.1 GENETIK DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Die Restriktions-, Hybridisierungs-, PCR- und Sequenzierdaten der verschiedenen YAC- und BAC-Klone ermöglichen eine Charakterisierung der HF-Genfamilie und erlauben somit eine Beantwortung der in Kap. 5.1 gestellten Fragen: Liegen alle Gene, die für die bisher entdeckten Proteine bzw. mRNS kodieren in derselben Region auf Chromosom 1q32?

Wenn ja, wie sind die Gene zueinander angeordnet und wie eng sind sie gekoppelt? Gibt es noch weitere HF1-verwandte Gene? Gibt es Erklärungen für die Anordnung der Gene bzw. Hinweise auf die Entstehung dieser Genfamilie? Welche SCR-Domänen bzw. SCR-Kombinationen sind die ursprünglichsten? Kann man Aussagen über die Evolution der HF-Genfamilie treffen? Welche Gene liegen in unmittelbarer Nachbarschaft der Genfamilie? Sind die benachbarten Gene strukturell verwandt mit HF1? Im Folgenden werden diese Fragen diskutiert.

6.1.1 GENETISCHE ORGANISATION DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Alle untersuchten HF-verwandten Gene (HF1- 6) wurden mit Hilfe von YAC- und BAC-Klonen in dieselbe Region auf Chromosom 1q32 kartiert. Die untersuchten YAC und BAC und die Gene, die auf ihnen lokalisiert wurden, sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Gen	Y A8	Y B2*	Y C2	Y F9	Y G1	Y H5*	B A8	B B20	B M12	B P20
HF1	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
HF2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
HF3	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
HF4	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
HF5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
HF6	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
F13B	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
PCP-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 11: Gengehalt der untersuchten YAC- und BAC-Klone.

In der Tabelle sind alle analysierten YAC- und BAC-Klone und die Gene, die auf ihnen lokalisiert sind aufgeführt. YAC-Klone tragen den Buchstaben »Y« und sofern sie chimärlich sind einen Stern »*«. BAC-Klone sind mit »B« bezeichnet. »+« bedeutet, daß das gesamte Gen oder Teile des Gens auf dem Klon enthalten sind, »-« zeigt das Fehlen des Gens an. Die Gene kodierend für Faktor H und die Faktor H-verwandten Gene sind mit HF1- 6 bezeichnet. F13B kodiert für das mit Faktor H strukturell verwandte Protein des Blutgerinnungsfaktors 13B und PCP-2 für die Rezeptorphosphatase 2 (siehe Text).

Von 6 untersuchten YAC-Klonen waren 2 chimärlich, sie sind in Tabelle 11 mit einem Stern markiert und wurden nicht komplett analysiert. Zwei (A8 und G1) der vier nicht-chimärlichen Klone enthalten alle Gene der HF-Genfamilie (HF1- 6) und zusätzlich F13B, das für die β -Kette des Blutgerinnungsfaktors 13 kodiert. Die Klone C2 und F9 enthalten nicht alle getesteten Gene. F9 ist an einem Ende kürzer als A8, es fehlt das HF1-Gen. C2 enthält HF1 und zusätzlich HF5 (Sequenziererergebnisse siehe Kap. 5.1.1.2). Dieser Klon enthält noch ca. 900 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des HF1-Gens. In diesem Bereich konnte das Gen PCP-2, kodierend für die Rezeptorphosphatase 2, lokalisiert werden. PCP-2 gehört zu einer Genfamilie von Rezeptorphosphatasen, deren bekanntestes Mitglied CD45 ist, dessen Gen auch auf Chromosom 1q32 liegt (Charbonneau et al., 1988; Tonks, et al. 1988, 1990). Das PCP-2-Gen wurde zytogenetisch und mit Hilfe somatischer Zellhybride in dieselbe Region auf Chromosom 1 lokalisiert und wurde hier auch physikalisch in die Nähe von HF1 kartiert (Akao et al., 1987).

Aufgrund der Restriktionsanalyse der YAC- und BAC-Klone, der daraus abgeleiteten Genanordnung und von Sequenz- und PCR-Ergebnissen, muß eine Deletion von ca. 40 kb im YAC C2 angenommen werden (siehe Abbildung 46). Durch diese Deletion gingen die Gene HF2 und HF4 verloren, die im kompletten Haplotyp zwischen HF1 und HF5 liegen. Diese Deletion wurde auch bei den chimärlichen Klonen B2 und H5 beobachtet (Tabelle: PCR-Daten, Kap. 5.1.1.1); sie wird im Kap. 6.1.3 diskutiert. Die Faktor H-Genfamilie liegt hier in zwei Haplotypen von, einem vollständigen (YAC A8, G1 und F9) und einem mit Deletion im Bereich der Gene HF2 und HF4 (YAC C2 und B2). Die analysierten YAC erstrecken sich zusammen über einen Bereich von 2,4 Mb genomischer DNS. Alle untersuchten HF1-verwandten Gene konnten mit Hilfe dieser YAC-Klone lokalisiert werden. Die Gene der HF-Familie liegen zusammen auf einem DNS-Fragment von ca. 400 kb und sind flankiert von F13B und PCP-2.

Um die Anordnung und Transkriptionsrichtung der betreffenden Gene zu bestimmen, wurden BAC analysiert. Von den vier untersuchten BAC-Klonen enthalten zwei (M12 und P20) einen Teil des HF1-Gens (SCR6-3'UT) und das ganze HF4-Gen. Auf P20 wurde zusätzlich der 5'-Teil von HF2 mit den SCR1 und 2 lokalisiert. BAC A8 enthält HF2 und HF4 vollständig. Diese drei Klone überlappen, was aus den Restriktionskarten deutlich hervorgeht (Abbildung 36, Kap. 5.1.4.4). Nicht überlappend mit diesen drei ist BAC B20, auf dem die Gene F13B, HF3, HF5 und weitere, HF1-verwandte Gensequenzen (HF6) liegen. Ob diese Sequenzen von einem oder mehreren Genen stammen, konnte noch nicht geklärt werden.

Wie sind nun die Gene der HF-Familie angeordnet? Das Faktor H kodierende Gen HF1 nimmt ca. 100 kb ein und ist an seinem 5'-Ende flankiert von PCP-2. Anschließend an das 3'-Ende von HF1 folgen die Gene HF4 und HF2 in Tandemorientierung zu HF1. Nach den Hybridisierungsdaten zu urteilen erstrecken sich die Gene HF4 maximal über ca. 40 kb und HF2 maximal über ca. 25 kb.

Mit einem Abstand von ca. 20 kb, der sich aus den nicht-überlappenden BAC im Vergleich mit den YAC ermitteln läßt, schließen sich an HF2 das Gen HF5 an gefolgt von HF3, HF6 und F13B. Die Position von HF5 kann aufgrund der Überlappung von YAC B2 und C2 ermittelt werden, da C2 nur HF1 und HF5 trägt, HF2 und HF4 deletiert sind und die Gene HF3 und F13B nicht mehr auf diesem YAC liegen. Die Anordnung der Gene HF3, HF6 und F13B konnte nicht eindeutig bestimmt werden, es gibt jedoch Hinweise, daß F13B außerhalb der HF-Genfamilie in Richtung zum Zentromer von Chromosom 1 liegt (Heine-Suner et al., 1997). F13B gehört nicht zur HF-Genfamilie, ist jedoch strukturell sehr ähnlich zu Faktor H. Das F13B-Protein ist eine Untereinheit des im Plasma zirkulierenden tetrameren Blutgerinnungsfaktors F13 bestehend aus zwei katalytisch-aktiven α - und zwei, vermutlich für die Struktur des Proteins zuständigen β -Ketten. F13 spielt eine wichtige Rolle bei der Verklumpung von Fibrin, der Fibrinolyse und Wundheilung (Nonaka et al., 1993). F13B enthält 10 SCR-Domänen, manche davon sind homolog zu HF1-SCR (siehe Abbildung 49).

Die HF-Genfamilie ist also auf einer Seite von einem strukturell unverwandten Gen, PCP-2, und auf der anderen Seite vom strukturell verwandten F13B flankiert.

Die Kopplung aller bisher bekannten Faktor H-verwandten Gene reflektiert deren Entstehung durch Duplikationsereignisse. Ob der Erhalt dieser Kopplung auf funktionale und regulatorische Koordination zurückzuführen ist, läßt sich nur spekulieren.

Die YAC A8, C2, F9, G1 (nicht-chimärisch), B2 (chimärisch) und alle BAC (A8, B20, M12, P20) sind in der folgenden Abbildung (Abbildung 47) mit den von ihnen abgeleiteten Genlokalisationen dargestellt.

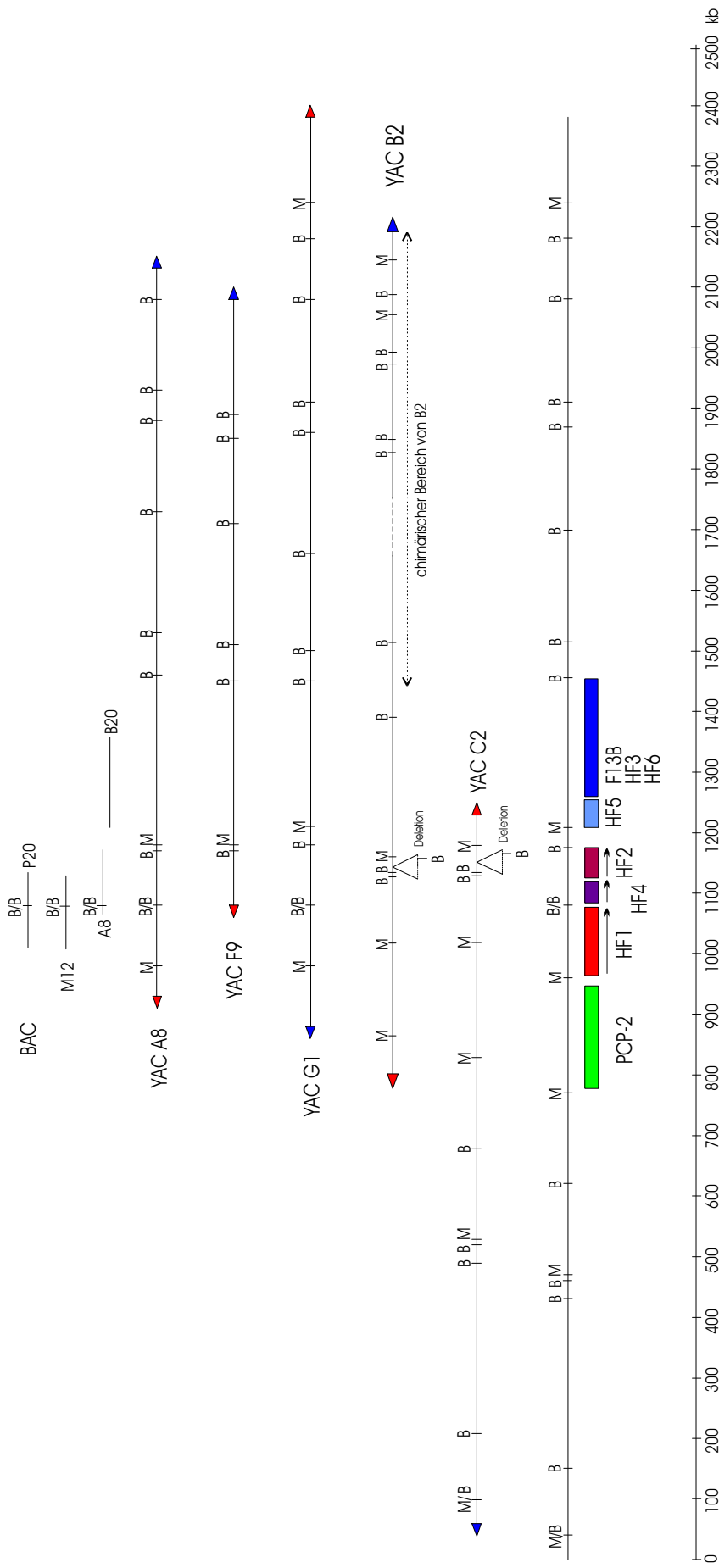


Abbildung 47: Die Faktor H-Genfamilie: Restriktionskarten und abgeleitete Genlokalisierungen der analysierten YAC- und BAC-Klone.

Im oberen Teil der Abbildung befinden sich die Restriktionskarten der YAC und BAC. Die Restriktionsschnittstellen sind mit Buchstaben gekennzeichnet, wobei B = BssH II und M = Mlu I bedeuten. Bei den BAC sind nur die BssH II-Schnittstellen angegeben (für ausführlichere Restriktionskarten siehe Kap. 5.1.4.3). Die genomische Insertion ist durch eine Linie, die YAC-Vektorenden sind durch rote (zentromerisches Ende) bzw. blaue (azentromerisches Ende) Dreiecke symbolisiert. Die BAC-Vektorenden sind nicht angegeben. Die Insertion von YAC C2 trägt eine Deletion, die auch eine BssH II-Schnittstelle beinhaltet. Das deletierte Fragment ist unter der betreffenden Region des YAC angegeben. Ebenfalls eine Deletion findet man in YAC B2, der zusätzlich am anderen Ende chimärisch ist. Unter den Restriktionskarten befindet sich die von ihnen abgeleitete Karte der genomischen Region. Die darauf lokalisierten Gene sind mit farbigen Kästchen markiert, die sich unter dem jeweiligen hybridisierenden Fragment befinden. Die Pfeile unter den Kästchen markieren die Orientierung des Gens; die Pfeilspitze weist Richtung 3'-Ende. Die Reihenfolge der Gene HF3, HF5, HF6 und F13B ist nicht geklärt.

6.1.2 PROBLEME BEI DER GENETISCHEN ANALYSE DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Die Untersuchung der genetischen Organisation von Genfamilien wird erschwert durch die teilweise sehr hohen Sequenzhomologien der einzelnen Gene, die PCR und Southernblotybridisierungen beeinflussen können. So ergaben die genspezifischen Sonden zur YAC-Kartierung meist Kreuzhybridisierungen, deren Intensität mit den eigentlichen Signalen vergleichbar war. Eine Zuordnung der Gene zu bestimmten Restriktionsfragmente erschwerte sich dadurch (siehe Abb. 20-24 Kap. 5.1.3.1). Hilfe bei der Genzuordnung ermöglichten die Überlappung der Restriktionsschnittstellen der Klone und die PCR-Ergebnisse. Da jedoch auch die Oligonukleotide, gerade bei der Amplifikation von YAC- und BAC-DNS, häufig an homologe Sequenzen verwandter Gene binden, erhält man in manchen Fällen auch bei der PCR uneindeutige Ergebnisse. Die PCR-Produkte sollten zur Sicherheit sequenziert werden, auch wenn sie der erwarteten Größe entsprechen.

Eine weiteres Problem bei der Untersuchung von Genfamilien stellt sich bei der Southernblotanalyse von genomischer DNS. Da meist nicht alle Gene und Pseudogene der Genfamilie bekannt sind, erhält man Restriktionsfragmente, die man den bekannten Genen der Familie nicht zuordnen kann. Meist muß man deshalb davon ausgehen, daß man nicht die gesamte Genfamilie kennt und für nicht einzuordnende Fragmente weitere, noch nicht beschriebene Gene annehmen.

6.1.3 EVOLUTION DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Faktor H ist ein phylogenetisch sehr altes Protein: Orthologe wurden bei *C. elegans* (NHL = nematode H like protein), bei einem Knochenfisch (SBP1 = sand bass cofactor protein 1 von *Parablax nebulifer*) und bei mit dem Menschen näher verwandten Spezies wie z.B. Maus und Ratte (Wilson et al., 1994; Dahmen et al., 1994; Vik et al., 1988; Daha und van Es, 1982) gefunden. Dies belegt auch die Annahme der Ursprünglichkeit des alternativen Komplementaktivierungsweges im Vergleich zum Antikörper-abhängigen klassischen Komplementweg. Bei vielen Spezies wurden neben Faktor H-Homologen auch Homologe zu den Faktor H-verwandten Proteinen/Genen beschrieben. So das Protein SBCRP-1 (sand bass cofactor related protein) von *P. nebulifer* und vier HF1-verwandte Transkripte bei der Maus (Zipfel et al., 1996; Vik et al., 1990).

Für die meisten HF1-verwandten Gene wird angenommen, daß sie entweder durch Duplikation und nachfolgende Sequenzveränderungen aus HF1 entstanden sind oder, daß die HF-verwandten Gene und HF1 selbst, sich von einem gemeinsamen Vorläufer ableiten lassen (für SBP1 und SBCRP-1 bei Krushkal et al., 1998). Beim Menschen wurden bisher 5 HF1-verwandte Transkripte/Proteine identifiziert, ein sechstes ist noch nicht vollständig charakterisiert (siehe

Kap. 1.3.2 und 5.1.4.3). Wahrscheinlich sind auch die HF1-verwandten Gene durch Duplikationen des HF1-Gens oder einzelner SCR-Exons entstanden. Die genomische Anordnung der Gene könnte Hinweise zu ihrer Entstehung geben.

Die in tandem eng beieinander angeordneten Gene HF1, HF4 und HF2 spiegeln ihre Evolution wieder. Die Herkunft von HF4 und HF2 aus HF1 zeigt zwei prinzipielle Möglichkeiten der Entstehung von HF-verwandten Genen. HF4 kodiert 5 SCR-Domänen, deren homologe »Eltern-SCR-Domänen« – SCR6, 7, 8, 19 und 20 – mit hoher Sequenzidentität im HF1-Gen zu finden sind. HF4 könnte also aus einer Duplikation von HF1 mit nachfolgenden Deletionen einiger SCR-Domänen stammen.

Zur Entstehung von HF2 wurden die von HF1 stammenden Exons auf ähnliche Weise zusammengestellt. Das 3'-Ende des HF2-Gens (SCR3-5) ist einschließlich der Intronsequenzen praktisch identisch mit den korrespondierenden SCR18, 19 und 20 von HF1. SCR1 und 2 von HF2 dagegen haben geringere Homologie zu den HF1-SCR6 und 7. Die Entstehung von HF2 könnte man sich ebenfalls durch Duplikationen von HF1 erklären. Der 3'-Teil des Gens wurde nahezu unverändert in HF2 enthalten, wogegen die Exons, die für die ersten zwei SCR-Domänen kodieren, viele Austausche enthalten.

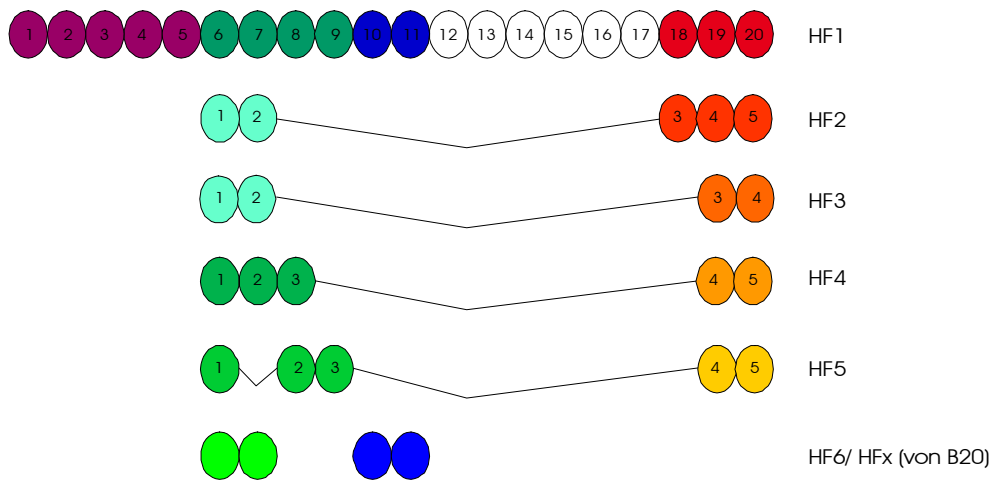


Abbildung 48: Vergleich der cDNS der Faktor H-Genfamilie.

Schematische Darstellung der 5 verschiedenen, vollständigen cDNS und der 2 cDNS-Fragmente, die für FH und die FHRP kodieren. Die Exonsequenzen, die SCR-Domänen kodieren, sind durch Ovale symbolisiert, deren Numerierung sich auf das jeweilige SCR bezieht. Die Farben der Ovale spiegeln die Ähnlichkeit der DNS-Sequenzen wieder. Exons, die für homologe Domänen kodieren sind untereinander gerückt. Vom neuen Gen (HF6) sind nur vier Exons der cDNS bekannt.

Alle bekannten cDNS bauen sich bis auf das Signalpeptid und den 3'UT aus SCR-kodierenden Exons auf.

Die Gene HF3 und HF5 lassen sich in die beiden Gruppen aufteilen. HF3 ist sehr ähnlich zu HF2 und könnte auch durch Duplikation dieses Gens unter Verlust eines SCR-kodierenden Exons entstanden sein, oder wie HF2 durch eine Duplikation von HF1 mit nachfolgenden Deletionen. HF5 schließlich folgt in seinem Aufbau und den Homologien dem HF4-Gen. Es ist ausschließlich aus zu HF1 sehr ähnlichen SCR-Domänen zusammengesetzt und könnte wie HF4 aus einer Duplikation von HF1 mit darauffolgenden Deletionen im Gen stammen. Betrachtet man den SCR-Gehalt der HF1-verwandten Gene, so fällt auf, daß alle der vollständig charakterisierten Gene, 2-3 SCR-Domänen homolog zu den 3'-Domänen 18, 19 und 20 von HF1 enthalten und mehr oder weniger homologe Bereiche zu den HF1-SCR6, 7 bzw. 8 und 9. Die Homologien der einzelnen HF-Verwandten im Vergleich zu HF1 sind in der Abbildung 48 schematisch dargestellt. In diesen Regionen wurde bei Faktor H C3b-Bindungsstellen (Sharma und Pangburn, 1996) und Sialinsäureinteraktionsstellen lokalisiert (Ram et al., 1998). Ob diese Funktionen in den FHRP erhalten sind, konnte bisher experimentell nicht nachgewiesen werden. Unklar ist ebenso ihre Funktion im Liquor cerebrealis, wo FHRP1 und 2 von uns entdeckt wurden.

6.1.4 HOMOLOGIEN UND DUPLIKATIONEN BEI DEN GENEN DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Die Faktor H-Familie umfaßt mindestens 6 Gene (HF1- 6), die für komplett aus SCR-Domänen zusammengesetzte Proteine kodieren. Die Entstehung dieser Genfamilie kann, wenn man Homologien der verschiedenen SCR-Domänen betrachtet, auf Duplikationsereignisse einzelner oder mehrerer SCR-kodierender Exons zurückgeführt werden.

Eng verwandt sind z.B die SCR-Domänen HF1 19, HF2 4, HF3 3, HF4 4 und HF5 4, die zusammen mit den SCR7 und 9 von F13B wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung haben (AS-Sequenzvergleiche). Weitere Verwandtschaftsbeziehungen ergeben sich für die SCR HF1 20, HF2 5, HF3 4, HF4 5, HF5 5 und F13B 8 und 10, die zu einer Gruppe zusammengefaßt werden können. Eine andere Gruppe wird von den SCR HF1 8 und 9 und den SCR HF5 2/HF4 3 bzw. HF5 3 gebildet. Zwei weitere größere Sequenzverwandtschaften befinden sich um die SCR6 und 7 von HF1, die mit Sequenzen aus HF2- 5 und aus BAC B20 Übereinstimmungen haben. Die Sequenzhomologien der neu entdeckten HF-verwandten Gensequenzen sind in Tabelle 12 dargestellt.

HF1	SCR6 (43 bp)	SCR10 (73 bp)	SCR11 (128 bp)
HF2	30,2 (42,8)	-	-
HF3	32,5 (50,0)	-	-
HF4	9,3 (7,1)	-	-

HF5	9,3 (14,3)	-	-
HF6 (B20)	11,6 (7,1)	26,0 (37,5)	16,4 (30,2)

Tabelle 12: Nukleotid- und Aminosäuresequenzunterschiede der aus B20 amplifizierten HF1-verwandten Sequenzen (HF6) im Vergleich zu den korrespondierenden HF1-Sequenzen. Die SCR6-ähnliche HF6-Sequenz ist mit allen homologen Sequenzen von HF2- 5 verglichen.

Dagegen stehen die für die C3b/FI-Interaktion zuständigen Domänen von HF (SCR1- 5) auffallend abseits von großen Sequenzhomologien zu den SCR-Domänen der HF-verwandten Proteine und F13B. Diese Faktor H-spezifischen Domänen wurden also nicht dupliziert und sind durch ihre Funktion und AS-Sequenz deutlich von den restlichen SCR abgesetzt.

Verschiedene andere SCR-Domänen von Faktor H haben dagegen, wie oben erwähnt, starke Sequenzähnlichkeit zu den Faktor H-verwandten Proteinen und zu F13B. Auch diesen Bereichen wurden bereits Funktionen – C3b-Interaktion und Sialinsäurebindungsstellen – zugewiesen, die jedoch weniger spezifisch sind als die komplementregulatorische Funktion von SCR1-5 von Faktor H (siehe Abb. 2, Kap. 1.3.1.2). Auffällig ist, daß sich die Sequenzhomologien in den Faktor H verwandten Genen/Proteinen vor allem auf die Bereiche SCR6-11 und die C-terminalen SCR18-20 erstrecken.

Von dem neuen HF-verwandten Gen HF6 sind nur vier SCR-Domänen bekannt, die zu SCR6 und 7 bzw. SCR10 und 11 von HF1 homolog sind. Es ist bisher nicht erwiesen, daß die erhaltenen Sequenzen zu einem Gen gehören, sie könnten auch von unterschiedlichen Genen stammen. Die Intronabschnitte zwischen den betreffenden Exons sind länger als diejenigen von HF1. HF6 ist das erste HF1-verwandte Gen, das SCR10/11 homologe Exons enthält. Welche Funktion in ihnen genau lokalisiert ist, ist nicht bekannt. Die vollständige cDNS-Sequenz des HF6-Gens muß noch aufgeklärt werden.

6.1.5 DUPLIKATIONEN UND DELETIONEN IN DER FAKTOR H-GENFAMILIE

Was ist nun die Ursache der zahlreichen Duplikationsereignisse, die zur Entstehung der HF-Genfamilie und zu F13B geführt haben und wie kann die Deletion innerhalb des HF2-Gens, die bei 4-5% im homozygoten (Feifel et al., 1992) und bei ca. 40% der untersuchten Personen im heterozygoten Zustand auftritt, erklärt werden? Zusammen mit HF2 wurde auch eine Deletion im HF4-Gen beobachtet (Kap. 5.2.3), die wahrscheinlich ebenso häufig auftritt. Beide HF-Haplotypen wurden mit den YAC-Klonen isoliert. Gibt es einen Zusammenhang zwischen diesen Deletionen und pathologischen Zuständen? Gibt es eine Erklärung für die Häufung von Duplikationen und Deletionen in diesem Chromosomenbereich?

Für Duplikationen können Rekombinationsereignisse verantwortlich sein, die in manchen Chromosomenregionen gehäuft auftreten. Heine-Suner et al. postulieren in einer 1997 veröffentlichten Arbeit zwei Regionen mit erhöhter Rekombinationshäufigkeit (recombination hot spots) im Bereich zwischen RCA- und Faktor H-Komplex. Ob es sich dabei tatsächlich um Regionen mit erhöhter Rekombinationsfrequenz handelt, kann aufgrund der geringen Zahl untersuchter DNS noch nicht definitiv gesagt werden. Es steht jedoch fest, daß die Gene der beiden Komplexe häufig Duplikationen unterworfen sind, die Pseudogene wie CR1 like und MCP like erzeugen oder eng verwandte Gene wie die HF2- 6 und die Duplikationen des C4BPA. Eine Ursache für die Entstehung von Genduplikationen sind Rekombinationsereignisse, die häufiger in DNS-Bereichen mit erhöhter Rekombinationsfrequenz beobachtet werden. Dies wurde z.B. für »de novo« Duplikationen und Deletionen bei verschiedenen Erbkrankheiten beschrieben, so bei Duchenne Muskeldystrophie, Charcot-Marie-Tooth-Hoffmann Krankheit Typ 1A und HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies) (Oudet et al., 1992; Reiter et. al., 1998; Potocki et al., 1999). Es ist wahrscheinlich, daß derartige Vorgänge auch bei der Entstehung des RCA- und Faktor H-Komplexes beteiligt sind. Ein weiteres Beispiel für eine Genfamilie stellen die Rezeptorphosphatasen dar, von denen zwei, CD45 und PCP-2, in dieselbe Region auf Chromosom 1 kartieren und möglicherweise ebenso durch Duplikation entstanden sind.

Die im HF2/4-Gen beobachteten Deletionen könnten auch auf fehlerhafte Rekombinationsereignisse zurückzuführen sein. In der Bande q32 von Chromosom 1 wurde eine »brüchige« Stelle lokalisiert, die mit Typ 1 bipolaren Störungen (manisch-depressive Zustände) assoziiert ist (Turecki et al., 1995). Ob diese brüchige Stelle nahe bei HF2 liegt, ist nicht bekannt. Die Deletionen im Bereich des HF2- und HF4-Gens, die nun mit einem auf PCR-basierenden Test nachgewiesen werden können, scheinen nicht mit einem offensichtlichen Phänotyp für Homo- und Heterozygote-Deletionsträger einherzugehen. Die Betroffenen sind unauffällig, ein vermuteter Zusammenhang mit rheumatischer Arthritis konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Kap. 5.3).

Kürzlich wurden Mutationen bzw. Deletionen im HF1-Gen mit dem hämolytischen urämischem Syndrom (HUS) in Verbindung gebracht und der Faktor H-Komplex als Kandidatenregion postuliert. Auf der Suche nach einem Kandidatengen für diese Krankheit in betroffenen Familien wurde entdeckt, daß ein Teil der Betroffenen eine Punktmutation in SCR20 von HF1 trägt, die zu einem Austausch von Arginin zu Glycin mit vermuteter Konformationsänderung im Molekül führt (Warwicker et. al., 1998). SCR20-homologe Sequenzen sind in HF2 und HF3 konserviert, jedoch nicht in HF4 und HF5. Der beschriebene AS-Austausch konnte nicht in HF2 oder HF3 gefunden werden. In einigen HUS-Betroffenen wurden keine Mutationen im HF1-Gen identifiziert. Daher ist zu vermuten, daß die Mutation in SCR20 nur einen gekoppelten Polymorphismus

darstellt. Die postulierte Kandidatenregion (Faktor H-Komplex) enthält viele potentielle Kandidatengene. Die Isolierung des HF-Komplexes erlaubt es nun, die Gene zu identifizieren, die wirklich für familiäres HUS verantwortlich sind. Eine Beteiligung von Faktor H als prädisponierender Faktor für das Auftreten von HUS nach einer E. coli-Infektion ist möglich, da HUS häufiger bei Personen mit verminderter Faktor H-Konzentration im Serum auftritt. Ebenso könnte die polymorphe HF-Genfamilie in die Pathogenese dieser Krankheit, deren Ursache bisher nicht aufgeklärt ist, involviert sein.

6.2 EXPRESSION DER FAKTOR H-GENFAMILIE IM GEHIRN UND IN HIRNZELLINIEN

Die Aktivierung von Komplement spielt bei bakteriellen Infektionen (z.B. durch Neisserien) des Gehirns eine wichtige Rolle. Einen eher negativen Effekt hat die Aktivierung von Komplement bei Verletzungen des ZNS, bei Erkrankungen wie Alzheimer und MS (Rogers et al., 1992, Walker und McGeer, 1992; Sellebjerg, et al., 1998). Da Serumproteinen der Zugang zum Gehirn im Normalfall durch die Blut-Hirn-Schranke verweigert ist, muß das Gehirn über Möglichkeiten zur Synthese von Komplementproteinen und deren Regulatoren verfügen. Die meisten an der Komplementaktivierung und -regulation beteiligten Proteine wurden bereits in verschiedenen Glioma-/Astroglia-Zelllinien nachgewiesen (Gasque et al., 1993, Gasque et al., 1995, Walker et al., 1995, Vedeler et al., 1994). Auch Faktor H wurde bereits in verschiedenen Astrogliazelllinien und Oligodendrozyten nachgewiesen, wogegen keine Daten über das Vorkommen der FHRP im Gehirn vorliegen (Gasque et al., 1992; Gasque und Morgan, 1996).

Die Entdeckung von FHRP1, FHRP2 neben Faktor H_{gp150} und FH_{p43} in Liquorproben von Patienten der Neuropathologie (Proben wurden freundlicherweise von Prof. Mehrain zur Verfügung gestellt) veranlaßte uns die Expression der HF-Genfamilie in verschiedenen Gehirnarealen, unstimulierten und IFN γ -, IL4- und IL6-stimulierten Gliomazelllinien zu untersuchen.

6.2.1 EXPRESSIONSMUSTER UND FUNKTION DER HF-GENFAMILIE IM GEHIRN UND IN GLIOMAZELLINIEN

Alle Gene der HF-Familie sind im Gehirn, – wenn auch größtenteils schwach und nur mittels RT-PCR nachweisbar –, exprimiert. Auch das Faktor H spezifische Transkript wurde in allen untersuchten Gehirnarealen und Gliomazelllinien gefunden. Auf RT-PCR-Ebene war die Expression im Plexus chorioideus besonders stark (dieser Bereich war auch im Northernblot als einziges Gehirngewebe für HF1 positiv). Die Ergebnisse der RT-PCR sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Im Northernblot konnten nur die HF1-Transkripte von 4,3 kb und 1,8 kb, nicht jedoch die Transkripte von HF2 und 3 in den Gliomazelllinien nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Nachweis der Expression HF1- 5 im Gehirn und in Gliomazelllinien

	HF1	HF2	HF3	HF4	HF5
Leber	+++	+++	+++	+++	+++
weiße Substanz	+	-	-	+	+
graue Substanz	+	+/-	-	+	+
Plexus chorioideus	++	-	-	+	+
Stammganglion	+	-	-	+	+
Pons	+	-	-	+/-	+
Kleinhirn 1	+	-	-	+	+
Kleinhirn 2	+	-	-	+	+
N59	+	++	-	+	+
T98 G	+	++	-	+	+

In der Tabelle sind die Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis von HF1- 5 in Gehirn und Gliomazelllinien zusammengefaßt. Als Positivkontrolle diente Leber-cDNS.

»+«: Bande gut zu sehen »+/-«: Bande schwach
 »++«: Bande stark »-«: keine Bande zu sehen
 »+++«: Bande sehr stark

Die Aufgabe von Faktor H im Gehirn liegt nahe: da C3 auch hier spontan aktiviert wird und die Komplementkaskade in Gang setzen könnte, schützt Faktor H das Gehirn vor unerwünschter Aktivierung des alternativen Komplementweges. Dieser ist ja, aufgrund des »tick-over« (siehe Kap. 1.3.1.1) von C3, auch im nicht aktivierten Zustand auf geringem Niveau aktiv. Abgesehen von dieser Schutzfunktion, die Faktor H im gesunden Gehirn ausführt, muß man seine Aufgabe bei pathologischen Prozessen, wie bakteriellen Infektionen, entzündlichen und traumatischen Ereignissen (Ischämie) im Gehirn betrachten, die eine Aktivierung des alternativen Komplementweges hervorrufen. Darauf werden wir genauer im folgenden Kapitel im Zusammenhang mit der IFN γ -Stimulation der Gene HF1- 5 eingehen.

Faktor H wird im Gehirn selbst gebildet und in den Liquor sekretiert. Welche Gehirnzellen oder Areale sind für die Faktor H-Synthese zuständig? Bisher wurden Faktor H-Transkripte bzw. Protein in verschiedenen Astroglioma-, Oligodendrozyten und Gehirndothel nachgewiesen (Gasque et al., 1992; Gasque und Morgan, 1996; Vastag et al., 1998). Da in allen hier untersuchten Geweben HF-Transkripte auf RT-PCR-Ebene nachweisbar waren, kann man annehmen, das Faktor H von allen Gehirnzellen bzw. von den im Gehirn verteilten Gliazellen gebildet werden kann. Die daraufhin untersuchten Gliomazelllinien zeigten starke Expression von HF1, dessen Transkript auch im Northernblot nachweisbar war. Dies könnte ein Hinweis

darauf sein, daß HF1 vorallem in Gliazellen und Astrozyten transkribiert wird und weniger in Neuronen. Auf RT-PCR Ebene war von den untersuchten Geweben HF1 besonders stark im Plexus chorioideus transkribiert. Dieser Bereich – ein dichtes Geflecht aus Kapillaren – ist für die Produktion des Liquor cerebri zuständig. Eine starke Expression des HF1-Gens in diesem Bereich ist also sinnvoll, da durch den Liquor Faktor H in alle Bereiche des Gehirns gelangen und seine Funktion erfüllen kann. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen von Vastag (1998), die Faktor H in Hirnendothelzellen nachweisen konnten. Im Westernblot fiel auf, daß im Liquor verhältnismäßig zu FH_{gp150} (Faktor H) mehr FH_{p43} vorhanden ist als im getesteten Serum derselben Personen (siehe Abb. 43, Kap. 5.4.1). Über Northernblot wurde wie bereits erwähnt das verkürzte 1,8 kb-HF1-Transkript nachgewiesen und der Effekt von IFN γ untersucht. Die 1,8 kb-Transkriptmenge steigt bei einer Zelllinie (T98G IFN γ) im Vergleich zum HF1-Transkript voller Länge stärker an (siehe Abb. 44, Kap. 5.4.1). Im Gehirn wird also das verkürzte HF1-Produkt verstärkt exprimiert und kommt auch in relativ großer Menge im Liquor vor. FH_{p43} hat wie Faktor H komplementregulatorische Eigenschaften. Es ist jedoch kleiner und könnte so schneller an die benötigte Stelle im Gehirn gelangen und dort seine Funktion erfüllen.

Auch die Faktor H-verwandten Proteine FHRP1 und FHRP2 wurden mit Westernblotanalyse im Liquor entdeckt. Über die Funktion dieser Proteine gibt es bisher keine sicheren Hinweise (Kap 1.3.2.2). Die Untersuchungen der Transkription der betreffenden Gene HF2 (kodiert für FHRP1) und HF3 (kodiert für FHRP2) zeigten, daß HF2 nur in der grauen Substanz und den unstimulierten Gliomazellen N59 und T98G exprimiert wird. Für HF3 waren alle untersuchten Gewebe und Zelllinien negativ (zwei Proben waren sehr schwach positiv). Wie kommt HF3 in den Liquor (siehe Abbildung 43, Kap. 5.4.1), wenn es kaum von Gehirnzellen gebildet wird und nur in einer Gliomazelllinie kaum nachweisbar transkribiert wird? Entweder ist das geringe Expressionsniveau des HF3-Gens ausreichend um das Protein im Liquor nachweisen zu können, oder aber das Vorhandensein von FHRP2 im Liquor ist ein pathologisches Zeichen. Die Liquorproben wurden, wie schon erwähnt (Kap 5.1) von Patienten mit Verdacht auf Multiple Sklerose bezogen. Bei MS kann es zu zeitweiliger Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke und damit einhergehendem Übertritt von Serumproteinen in den Liquor kommen (Gay und Esiri, 1991). Da uns keine Liquorproben von gesunden Probanden zur Verfügung standen, kann diese Frage nicht eindeutig beantwortet werden.

HF2 dagegen wird in verschiedenen Gehirnarealen und allen Gliomazelllinien transkribiert. Anders als bei HF1 scheinen nicht die Endothelzellen des Plexus chorioideus, sondern die Gliazellen der Hauptsyntheseort von FHRP1 zu sein.

Die anderen Faktor H-verwandten Proteine FHRP3 und 4 konnten nicht im Liquor nachgewiesen werden, da kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Die Transkription der betreffenden

Gene HF4 und HF5 wurde nur mittels RT-PCR in verschiedenen Gehirnbereichen und Gliomazelllinien untersucht. Beide Gene sind in allen untersuchten Geweben und Zelllinien auf geringem Niveau exprimiert. Welche Aufgabe könnten die HF-verwandten Proteinen FHRP1 und 2 haben, die im Liquor nachweisbar sind, im Gehirn haben? Eine Rolle bei entzündlichen oder anderen pathologischen Prozessen scheinen die FHRP nicht zu spielen, da keine Stimulierbarkeit mit IFN γ , IL4 oder IL6 gefunden wurde (siehe folgendes Kapitel). Da sie keine komplement-regulierenden Eigenschaften besitzen, liegt nahe, daß sie nur einen Liquorbestandteil von untergeordneter Bedeutung darstellen. Ein Fehlen, z.B. von FHRP1 wird relativ häufig beobachtet (4-5%). Ob der von Park und Wright (1996) beschriebene Plasmapartikel, indem die FHRP 1 und 2 enthalten sind und der die LPS-induzierte integrinvermittelte Adhäsion von PMN fördert, auch im Liquor vorkommt, ist nicht bekannt. Die Aufgabe der FHRP im Liquor bleibt offen.

6.2.2 REGULATION DER EXPRESSION DER HF-GENFAMILIE IN GLIOMAZELLINIEN DURCH IFN γ , IL4 UND IL6

Die meisten Komplementproteine werden in der Leber synthetisiert und gehören zu den Akute-Phase-Proteine (APP), das heißt ihre Transkriptionsrate erhöht sich in Folge von Gewebeverletzung und Entzündungsreaktionen. Die Hauptaufgabe der APP ist die Erkennung und Eliminierung von Pathogenen, der Schutz der Gewebe vor inflammatorischen proteolytischen Enzymen und Sauerstoffmetaboliten sowie die Reorganisation betroffener Gewebe (Volonakis, 1995). Die Transkriptionsrate der meisten APP wird hauptsächlich durch die inflammatorischen Cytokine IL6, IL1 und TNF α reguliert. Die Transkription der Komplementproteingene wird vor allem durch IFN γ stimuliert (Boehm et al., 1997).

Die Bildung der Komplementproteine ist nicht auf die Leber beschränkt. Viele Zellen und Gewebe sind zur Synthese dieser Proteine fähig. Im Gehirn wird der Großteil der Komplementproteine von Astrozyten und Gliazellen gebildet (Morgan und Gasque, 1996). Die Syntheserate ist relativ gering, kann jedoch wie auch in vielen anderen Geweben durch IFN γ gesteigert werden. Astrozyten sind selbst auch zur Synthese von IFN γ und anderer Cytokine fähig, und können so autokrin die Transkription der Komplementgene verstärken (Snider, 1994; Zhao et al., 1998; Fabry et al., 1994). IL6 kann auch im Gehirn gebildet werden und ist im Falle hoher Konzentrationen ein Marker für z.B. Entzündungen und Erkrankungen wie MS und Alzheimer, dies trifft auch für die anderen Cytokine zu (Kossmann et al., 1996; Gruol et al., 1997; Zhao und Schwartz, 1998). IL4 ist ein weiterer wichtiger Mediator der Immunantwort. Im Gehirn fungiert es als Regulator der Proliferation der Astrozyten (Lui et al., 1997). Auch Faktor H ist ein Akute-Phase-Protein, dessen Transkription – wie die der meisten Komplementproteine – hauptsächlich durch

IFN γ stimuliert wird. Dies wurde nicht nur für Hepatozyten sondern auch für extrahepatische Gewebe von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben: in Endothelzellen (HUVEC), Hautfibroblasten, Monozyten und Gliomazellen (Williams und Vik, 1997; Ripoche et al., 1988; Katz und Strunk, 1988, Lappin und Whaley, 1990; Gasque et al., 1992). Ein »IFN-response element« wurde bisher im HF1-Gen noch nicht identifiziert, die Stimulation der Genexpression erfolgt jedoch auf Transkriptionsebene (Williams und Vik, 1997). Über die Stimulierbarkeit der HF1- verwandten Gene HF2- 5 ist wenig bekannt. Bettina Dierl untersuchte mittels RT-PCR in ihrer Diplomarbeit die Expression von HF1- 4 bei den Zelllinien Mono-MAC6 (Makrophagen) und U937 (humanes Histiocytelymphom) vor und nach Behandlung mit IFN γ . Dabei ließen sich HF1 und HF2 weder vor noch nach der Stimulation nachweisen, wogegen HF3- und HF4- Transkripte nach IFN γ -Behandlung gefunden werden konnten (Dierl, 1997). Wir untersuchten die Stimulation von HF2- 5 durch IFN γ bei drei verschiedenen Gliomazelllinien – N59, N63 und T98G – mittels Northernblot und RT-PCR. Die Stimulation dieser Gene mit IL4 und IL6 wurde nur mittels Northernblot getestet. Da bei diesen Gliomazelllinien die Stimulation von HF1 durch IFN γ , IL4 und IL6 noch nicht untersucht wurde, wurde auch dies getestet. Die Ergebnisse RT-PCR nach IFN γ -Stimulation sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Im Northernblot waren nur HF1-Transkripte detektierbar (siehe Kap. 5.4.2, Abbildung 44), eine Stimulation der Gene HF1- 5 mit IL4 und IL6 konnte mittels Northernblot nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Expression der Faktor H Genfamilie in Gliomazelllinien nach IFN γ -Stimulation

	HF1	HF2	HF3	HF4	HF5
Leber	+++	+++	+++	+++	+++
N59	+	+	-	+	+
N59 IFN γ stimuliert	++	+/-	-	+	+
N63	+	+	-	+	+
N63 IFN γ stimuliert	++	+/-	-	+	+
T98 G	+	+	+	+	+
T98 G IFN γ stimuliert	++	+/-	-	+	+

In der Tabelle sind die Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis von HF1- 5 in unstimulierten und IFN γ -stimulierten Gliomazelllinien zusammengefaßt. Als Positivkontrolle diente Leber-cDNS.

»+«: Bande gut zu sehen »+/-«: Bande schwach
 »+++«: Bande stark »-«: keine Bande zu sehen
 »++++«: Bande sehr stark

Die HF1-Transkripte steigen nach IFN γ -Stimulation deutlich bei allen drei Gliomzelllinien an, HF2 wird schwächer nachgewiesen als im unstimulierten Zustand, HF3 ist kaum transkribiert und die Menge der HF4- und HF5-Transkripte wird nicht von IFN γ beeinflusst.

Der IFN γ -vermittelte Transkriptanstieg von HF1 bei Gliomzelllinien spiegelt vermutlich auch das Verhalten der betreffenden Zellen im Gehirn wieder. Die Gliazellen umgeben die Axone der Neuronen und sind folglich im gesamten Gehirn verteilt. Im Falle von bakteriellen Infektionen des Gehirns (z.B. durch *Neisseria meningitidis*), neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. MS) und Verletzungen, die alle mit Bildung von IFN γ und demzufolge auch der Aktivierung von Komplement einhergehen, ist eine Kontrolle der Komplementaktivierung notwendig (Zhao und Schwartz, 1998). Die Transkriptmenge von HF1 wird ebenfalls gesteigert, so daß die Komplementattacke auf die Pathogene beschränkt bleibt, bzw. eingeschränkt wird. Faktor H fungiert also auch im Gehirn als APP, er wird von verschiedenen Zellen lokal gebildet und unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt exprimiert, um seine Schutzfunktion gegen eine Komplementattacke erfüllen zu können. Die Cytokine IL4 und IL6 haben keinen Einfluß auf die Transkription des HF1-Gens in den untersuchten Zelllinien. Die Transkriptmenge steigt nicht über die der unstimulierten Zellen.

Die Transkription der Gene für die Faktor H-verwandten Proteine FHRP1- 4 läßt sich nicht mit IFN γ stimulieren: bei HF4 und 5 bleibt die Transkriptmenge gleich schwach, HF3 wird weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand in N59 und N63 transkribiert, und von T98G nur im unstimulierten. Auf die Transkription von HF2 scheint IFN γ ähnlich wie bei HF3 einen negativen Einfluß zu haben. Die HF2-Transkriptmenge wird nach IFN γ -Stimulierung noch geringer.

Den HF1-verwandten Genen fehlt wahrscheinlich ein Response Element, daß wie bei HF1 die Akute-Phase-Antwort durch IFN γ vermittelt. Auch die Cytokine IL4 und IL6 haben keinen Einfluß auf die Transkriptionsrate der Gene HF2- 5. Die Faktor H-verwandten FHRP sind also im Gegensatz zu Faktor keine APP, ihre Transkriptionsrate wird nicht von IFN γ stimuliert und wie bei HF1 auch nicht von IL4 oder IL6 beeinflusst. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Proteine eine Rolle beim Schutz des Gehirns vor unerwünschten Folgen von Entzündungs- und Verletzungserscheinungen spielen.

Da die Faktor H-verwandten Gene jedoch, wenn auch auf geringem Niveau im Gehirn exprimiert werden und ein Teil der Faktor H-verwandten Proteine (FHRP1 und FHRP2) auch im Liquor nachgewiesen wurde, stellt sich immer noch die Frage nach ihrer Funktion im Gehirn.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit über die Organisation und Regulation der Faktor H-Genfamilie wurden folgende drei Themenkomplexe bearbeitet:

Zur Aufklärung der genomischen Organisation der HF-Genfamilie wurden humane Mega YAC- und BAC-Klone mittels Restriktionsanalyse, Southernblot hybridisierung, PCR und Sequenzierung analysiert. Alle Gene der Faktor H-Familie HF1- 5 konnten auf diesen Klonen lokalisiert werden, d.h. diese Genfamilie liegt zusammen auf einem DNS-Abschnitt von ca. 400 kb auf Chromosom 1q32. Weitere HF1-verwandte Genabschnitte wurde identifiziert, die in die Nähe von HF3, HF5 und F13B lokalisiert wurden. Flankierend zur Faktor H-Genfamilie wurden die Gene für F13B und PCP-2 kartiert. Die Gene können wie folgt von telomer nach zentromer angeordnet werden: PCP-2, HF1, HF4, HF2, HF5 gefolgt von HF3/HF6/F13B, deren Orientierung nicht eindeutig festgelegt werden konnte.

Die Häufung der HF-Gene auf einem DNS-Abschnitt und deren Anordnung in Tandem-Orientierung läßt vermuten, daß diese Genfamilie ihren Ursprung in Genduplikation hat. In dieser chromosomalen Region werden Rekombinations-Hotspots vermutet, die eine erhöhte Rekombinationsfrequenz verursachen infolge derer Duplikationen entstehen können. Durch Fehler bei der Rekombination kann es jedoch auch zum Verlust von genetischem Material kommen. Vermutlich kann man die Deletion im Bereich des HF2- und HF4-Gens, die bei 4-5% der untersuchten Probanden gefunden werden kann, durch einen solchen Mechanismus erklären. Diese Deletion, ein genetischer Marker in dieser Region, kann nun mit einem einfachen PCR-basierenden Test, festgestellt werden.

Die Isolierung und Kartierung des Faktor H-Genkomplexes erleichtert die Suche nach Kandidatengenen für das hämolytisch urämische Syndrom (HUS), da die Region als Kandidatenregion für dieses Syndrom identifiziert wurde. Es ist möglich, daß Faktor H oder die Faktor H-verwandten Proteine eine Rolle bei der Entstehung dieser Krankheit spielen.

Ob die oben erwähnten HF2-Deletion eine Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen insbesondere rheumatischer Arthritis, spielt, wurde an einem großen Patientenkollektiv untersucht. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen Deletion und Erkrankung gefunden.

Zur weiteren Untersuchung der Funktion der Faktor H-verwandten Proteine, wurde deren Expression auf Protein und mRNS-Ebene untersucht. Faktor H und die Faktor H verwandten Proteine 1 und 2 wurden im Liquor cerebrealis entdeckt. Der Hauptsyntheseort im Gehirn für

Faktor H scheint des Endothel des Plexus chorioideus und die Gliazellen zu sein. Die HF-
verwandten Transkripte sind nur auf geringem Niveau nachweisbar. Die Transkription von HF1
ist in den allen getesteten Gliomazelllinien mit IFN γ stimulierbar. Faktor H verhält sich also im
Gehirn, ebenso wie in der Leber, als Akute-Phase-Protein und verhindert eine ungewünschte
Komplementaktivierung im Zuge von Infektionen, Verletzungen und Erkrankungen des Gehirns.
Durch die inflammatorischen Cytokine IL4 und IL6 wird die Transkription von HF1 nicht
beeinflusst.

Die HF1-verwandten Gene HF1- 5 sind in den Gliomazelllinien nicht mit IFN γ stimulierbar
und auch IL4 und IL6 zeigen keinen Einfluß auf die Expression dieser Gene. Im Gegensatz
zu Faktor H sind diese Proteine wahrscheinlich nicht an der Akute-Phase-Antwort des Gehirns
beteiligt. Welche Aufgabe ihnen zufällt ist offen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Akao, Y., Utsumi, K.R., Naito, K., Ueda, R., Takahashi, T., and Yamada, K. (1987) Chromosomal assignments of genes coding for human leukocyte common antigen, T-200, and lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1 beta subunit. *Somat. Cell Mol. Genet.* 13, 273-278
- Akiyama, H., Yamada, T., Kawamata, T., and McGeer, P.L. (1991) Association of amyloid P component with complement proteins in neurologically diseased brain tissue. *Brain Res.* 548, 349-352
- Ault, B., Schmidt, B.Z., Fowler, N.L., Kashtan, C.E., Ahmed, A.E., Vogt, B.A., and Colten, H.R. (1997) Human factor H deficiency. *J. Biol. Chem.* 272, 25168-25175
- Avery, V.M., and Gordon, D.L. (1993) Characterization of factor H binding to human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 151, 5545-5553
- Blackmore, T.K., Sadlon, T.A., Ward, H.M., Lublin, D.M., and Gordon, D.L. (1996) Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J. Immunol.* 157, 5422-5427
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795
- Bordet, J., and Gengou, O. (1901) Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Ann. Inst. Past.* 15, 290-302
- Bottenus, R.E., Ichinose, A., and Davie, E.W. (1990) Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochem.* 29, 11195-11209
- Cannich, A. (1994) Organisation und Expression von Faktor H und der Faktor H-verwandten Gene. Diplomarbeit an der LMU München
- Carlson, M. and Laurent, B.C. (1994) The SNF/SWI family of global transcription activators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 396-402
- Carson, M., and Sutcliffe, J.G. (1999) Balancing function versus self defense: the CNS as an active regulator of immune response. *J. Neurosci. Res.* 55, 1-8
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A., and Fischer, E.H. (1988) The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7182-7186
- Choi, N.H., Nakano, Y., Tobe, T., Mazda, T., and Tomita, M. (1990) Incorporation of SP-40,40 into the soluble membrane attack complex (SMAC, SC5b-9) of complement. *Int. Immunol.* 2, 413-417
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Chowdhury, K., (1991) One step »minirep« method for the isolation of plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 19, 2792
- Cremer, M.A., Ye, X.J., Terato, K., Griffith, M.M., Watson, W.C., and Kang, A.H. (1998) Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 375-382

- Daha, M.R., and van Es, L.A. (1982) Isolation, characterisation, and mechanism of action of rat beta 1H. *J. Immunol.* 128, 1839-1843
- Dahmen, A., Kaidoh, T., Zipfel, P.F., and Gigli, I. (1994) Cloning and characterisation of a cDNA representing a putative complement regulatory plasma protein from barred sand bass (*Parablax nebulifer*). *Biochem. J.* 301, 391-397
- Dierl, B. (1997) Die humane Komplementfaktor H-Genfamilie: Expression, strukturelle und serologische Charakterisierung. Diplomarbeit an der LMU München
- DiScipio, R.G. (1992) Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J. Immunol.* 149, 2592-2599
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., and Müller, G.A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern-Blot analysis enables higher sensitivity than ³²P-based hybridization. *Anal. Biochem.* 210, 235-244
- Erdei, A., Füst, G., and Gergely, J. (1991) The role of C3 in the immune response. *Immunol. Today* 12, 332-337
- Estaller, C., Schwaeble, W., Dierich, M., and Weiss, E.H. (1991) Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternative spliced transcripts. *Eur. J. Immunol.* 21, 799-802
- Estaller, C., Koistinen, V., Schwaeble, W., Dierich, M. P., and Weiss, E. H. (1991) Cloning of the 1,4 kb mRNA species of the human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxyterminal of the classical 150-kDa molecule. *J. Immunol.* 146, 3190-3196
- Estaller, C., (1991) Struktur und Expression des humanen Komplementfaktor H: Charakterisierung von drei verschiedenen Faktor-H-Molekülen. Dissertation im Fachbereich Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Estaller, C. (1991) Struktur und Expression des humanen Komplementfaktor H: Charakterisierung von drei verschiedenen Faktor-H-Molekülen. Dissertation an der LMU
- Fabry, Z., Raine, C.S., and Hart, M.N. (1994) Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol. Today* 15, 218-224
- Feifel, E., Proding, W. M., Mölgg, M., Schwaeble, W., Schonitzer, D., Koistinen, V., Misasi, R., and Dierich, M. P. (1992) Polymorphism and deficiency of human factor H related proteins p39 and p37. *Immunogenetics* 36, 104-109
- Frank, M.M., and Fries, L.F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326
- Gasque, P., Fontaine, M., and Morgan, B.P. (1995) Complement expression in human brain. *J. Immunol.* 154, 4726-4733
- Gasque, P., Ischenko, A., Legoedec, J., Mauger, C., Schouft, M.-T., and Fontaine, M. (1993) Expression of the complement pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J. Biol. Chem.* 268, 25068-25074
- Gasque, P., Julen, N., Ischenko, A.M., Picot, C., Mauger, C., Chauzy, C., Ripoche, J., and Fontaine, M. (1992) Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines. *J. Immunol.* 149, 1381-1387
- Gasque, P., and Morgan, B.P. (1996) Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes. *Immunology* 89, 338-347

- Gasque, P., Jones, J., Singhrao, S.K., and Morgan, B.P. (1998) Identification of an astrocyte population from human brain that expresses perforin, a cytotoxic protein implicated in immune defense. *J. Exp. Med.* 187, 451-460
- Gasque, P., Thomas, A., Fontaine, M., and Morgan, B.P. (1996) Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins. *J. Neuroimmunol.* 66, 29-40
- Gay, D., and Esiri, M. (1991) Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. *Brain* 114, 557-572
- Gonzalez-Rubio, C., Saboya-Palero, A., Pascual-Salcedo, D., Balsa, A., Fontan, G., and Lopez-Trascasa, M. (1997) Elevated factor I levels in synovial fluid from patients with inflammatory arthropathies. *Immunopharmacology* 38, 159-165
- Gordon, D.L., Kaufman, R.M., Blackmore, T.K., Kwong, J., and Lublin, D.M. (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J. Immunol.* 155, 348-356
- Gruol, D.L., and Nelson, T.E. (1997) Physiological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 15, 307-339
- Heine-Suner, D., Diaz-Guillen, M.A., de Villena, F. P.-M., Robledo, M., Benitez, J., de Cordoba, S.R. (1997) A high-resolution map of the regulators of the complement activation gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* 45, 422-427
- Hellwage, J., Kühn, S., and Zipfel, P.F. (1997) The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochem. J.* 326, 312-327
- Hellwage, J., Skerka, C., and Zipfel, P.F. (1997) Biochemical and functional characterisation of the factor-H-related protein 4 (FHR-4). *Immunopharmacol.* 38, 149-157
- Hoggard, N., Brintnell, B., Howell, A., Weissenbach, J., and Varley, J. (1995) Allelic imbalance on chromosome 1 in human breast cancer. II. Microsatellite repeat analysis. *Genes Chromosome Cancer* 12, 24-31
- Hourcade, D., Holers, M., and Atkinson, J. P. (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45, 381-416
- Hynes, R.O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554
- Jenne, D.E., and Tschopp, J. (1989) Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7123-7127
- Jiang, H., Burdick, D., Glabe, C.G., Cotman, C.W., and Tenner, A.J. (1994) beta-Amyloid activates complement to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J. Immunol.* 152, 5050-5059
- Katz, Y., and Strunk, R.C. (1988) Synthesis and regulation of complement protein factor H in human skin fibroblasts. *J. Immunol.* 141, 559-563
- Kies, M.W. (1978) Autoimmunity in multiple sclerosis: do we have an experimental model? *Adv. Exp. Med. Biol.* 100, 277-288
- Koistinen, V. (1992) Effects of sulphated polyanions on functions of complement factor H. *Mol. Immunol.* 130, 113-117
- Kontinen, Y.T., Ceponis, A., Meri, S., Vuorikoski, A., Kortekangas, P., Sorsa, T., Sukura, A., and Santavirta, S. (1996) Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis.* 55, 888-894

- Kristensen, T., Ogata, R.T., Chung, L.P., Reid, K.B., and Tack, B.F. (1987) cDNA structure of murine C4b-binding protein, a regulatory component of the serum complement system. *Biochemistry* 26, 4668-4674
- Krushkal, J., Kemper, C., and Gigli, I. (1998) Ancient origin of human complement factor H. *J. Mol. Evol.* 47, 625-630
- Kühn, S., and Zipfel, P.F. (1996) Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur. J. Immunol.* 26, 2383-2387
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680
- Lappin, D.F., Birnie, G.D., and Whaley, K. (1990) Interferon-mediated transcriptional and post-transcriptional modulation of complement gene expression in human monocytes. *Eur. J. Biochem.* 194, 177-184
- Lengauer, C., Green, E.D., and Cremer, T. (1992) Fluorescence in Situ hybridisation of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 13, 826-828
- Lengauer, C., Riethman, H., and Cremer, T. (1990) Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cells by PCR with Alu and L1 primers. *Hum. Genet.* 86, 1-6
- Levi-Strauss, M., and Mallat, M. (1987) Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B. Two components of the alternative pathway of complement activation. *J. Immunol.* 139, 2361-2366
- Liu, C.-C., Walsh, C.M., and Young, J.D. (1995) Perforin: structure and function. *Immunol. Today* 16, 194-201
- Liu, J., Flanagan, W.M., Drazba, J.A., Estes, M.L., Barnett, G.H., Haqqi, T., Kondo, S., and Barna, B.P. (1997) The CDK inhibitor, p27Kip1, is required for IL-4 regulation of astrocyte proliferation. *J. Immunol.* 159, 812-819
- Malhotra, V., and Sim, R.B. (1985) Expression of complement factor H on the surface of the human monocytic cell line U937. *Eur. J. Immunol.* 15, 935-941
- Mathew, S., Murty, V.V., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S. (1994) Loss of heterozygosity identifies multiple sites to allelic deletions on chromosome 1 in human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 54, 6265-6269
- Matsushita, M., and Fujita, T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176, 1497-1502
- McGeer, P.L., Akiyama, H., Itagaki, S., Kawamata, T., Guan, A.L., Parker, C.J., Okada, N., and McGeer, E.G. (1989) Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci. Lett.* 107, 341-346
- Meri, S., and Pangburn, M.K. (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: Regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3982-3986
- Meri, S., and Pangburn, M.K. (1994) Regulation of the alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198, 52-59
- Misasi, R., Muemer, H.P., Schwaeble, W., Söldner, E., Larcher, C., and Dierich, M. P. (1989) Human complement factor H an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur. J. Immunol.* 19, 1765-1768
- Morgan, B.P., and Gasque, P. (1996) Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol. Today* 17, 461-466

- Nabil, K., Rihn, B., Jaurand, M.-C., Vignaud, J.-M., Ripoche, J., Martinet, Y., and Martinet N. (1997) Identification of human complement factor H as a chemotactic protein for monocytes. *Biochem J.* 326, 377-383
- Nonaka, M., Matsuda, Y., Shiroishi, T., Moriwaki, K., Nonaka, M., and Natsuumme-Sakai, S. (1993) Molecular cloning of the beta subunit of mouse coagulation factor XIII and assignment of the gene to chromosome 1: close evolutionary relationship to complement factor H. *Genomics* 15, 535-542
- Nonaka, S., Yasuda, M., and Nobunaga, M. (1993) In vitro rheumatoid factor production by peripheral blood mononuclear cells from patients with seronegative rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 20, 1478-1484
- Ohali, M., Shalev, H., Schlesinger, M., Katz, Y., Kachko, L., Carmi, R., Sofer, S., and Landau, D. (1998) Hypocomplementemic autosomal recessive hemolytic uremic syndrome with decreased factor H. *Pediatr. Nephrol.* 12, 619-624
- Ohtsuka, H., Imamura, T., Tanase, S., Okada, H., Ogawa, M., and Kambara T. (1993) Thrombin generates monocyte chemotactic activity from complement factor H. *Immunol.* 80, 140-145
- Oudet, C., Hanauer, A., Clemens, P., Caskey, T., and Mandel, J.L. (1992) Two hot spots of recombination in the DMD gene correlated with the deletion prone regions. *Hum. Mol. Genet.* 8, 599-603
- Pangburn, M.K., Atkinson, M.A., and Meri, S. (1991) Localization of the heparin-binding site in complement factor H. *J. Biol. Chem.* 266, 16847-16853
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., and Müller-Eberhard, H.J. (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein b1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* 146, 257-270
- Park, C. T., and Wright, S. D. (1996) Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 18054-18060
- Podack, E.R., Preissner, K.T., and Muller-Eberhard, H.J. (1984) Inhibition of C9 polymerisation within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Suppl.* 284, 89-96
- Podack, E.R., and Tschopp, J. (1984) Membrane attack by complement. *Mol. Immunol.* 21, 589-603
- Potocki, L., Chen, K.S., Koeuth, T., Killian, J., Iannaccone, S.T., Shapira, S.K., Kashork, C.D., Spikes, A.S., Shaffer, L.G., and Lupski, J.R. (1999) DNA rearrangements on both homologues of chromosome 17 in a mildly delayed individual with a family history of autosomal dominant carpal tunnel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 471-478
- Ram, S., Sharma, A.K., Simpson, S.D., Gulati, S., McQuillen, D.P., Pangburn, M.K., and Rice, P.A. (1998) A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 187, 743-752
- Reiter, L.T., Hastings, P.J., Nelis, E., De Jonghe, P., Van Broekhoven, C., and Lupski, J.R. (1998) Human meiotic recombination products revealed by sequencing a hotspot for homologous strand exchange in multiple HNPPdeletion patients. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1023-1033
- Rey-Campos, J., Baeza-Sans, D., and Rodriguez de Cordoba, S. (1990) Physical linkage of the human genes coding for complement factor H and coagulation factor XIII B subunit. *Genomics* 7, 644-646
- Rey-Campos, J., Rubinstein, P., and Rodriguez de Cordoba, S. (1988) A physical map of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J. Exp. Med.* 167, 664-669
- Ripoche, J., Mitchell, J.A., Erdei, A., Madin, C., Moffat, B., Mokoena, T., Gordon, S., and Sim, R.B. (1988) Interferon γ induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J. Exp. Med.* 168, 1917-1922

- Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., Civin, W.H., Brachowa, L., Bradt, B., Ward, P., and Lieberburg, I. (1992) Complement activation by β -amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10016-10020
- Rollins, S.A., and Sims, P.J. (1990) The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J. Immunol.* 144, 3478-3483
- Rooney, I.A., and Morgan, B.P. (1992) Characterization of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 antigen on human amniotic cells and in amniotic fluid. *Immunology* 76, 541-547
- Whaley, K., and Ruddy, S. (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1H globulin. *J. Exp. Med.* 144, 1147-1163
- Rougier, N., Kazatchkine, M.D., Rougier, J.-P., Fremeaux-Bacchi, V., Blouin, J., Deschenes, G., Soto, B., Baudouin, V., Pautard, B., Proesmans, W., Weiss, E., and Weiss, L. (1998) Human complement factor H deficiency associated with hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 2318-2326
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Ehrlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239, 487-489
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* (2nd ed.) Cold Spring Harbor Press
- Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int. Immunol.* 6, 665-669
- Sayetta, R.B. (1986) Theories of the aetiology of multiple sclerosis: a critical review. *J. Clin. Lab. Immunol.* 21, 55-70
- Schwaeble, W., Feifel, E., Estaller, C., Barbieri, A., Molgg, M., Koistinen, V., Weiss, E.H., and Dierich, M.P. (1991) Human complement factor H: molecular cloning and cDNA expression reveals variability in the factor H-related mRNA species of 1.4 kb. *Immunobiol.* 182, 307-322
- Schwaeble, W., Zwirner, J., Schulz, T.F., Linke, R.P., Dierich, M.P., and Weiss, E.H. (1987) Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur. J. Immunol.* 17, 1485-1489
- Schwaeble, W., Schwaiger, H., Brooisman, R.A., Barbieri, A., Most, J., Hirsch-Kauffmann, M., Tiefenthaler, M., Lappin, D.F., Daha, M.R., Whaley, K., et al. (1991) Human complement factor H. Tissue specificity in the expression of three different mRNA species. *Eur. J. Immunol.* 19, 399-404
- Sellebjerg, F., Christiansen, M., and Garred, P. (1998) MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 4, 127-131
- Sharma, A.K., and Pangburn, M.K. (1996) Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10996-11001
- Shrikant, P., and Benveniste, E.N. (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ. *J. Immunol.* 157, 1819-1822
- Sim, R.B., Kölbl, K., McAleer, M.A., Dominguez, O., and Dee, V.M. (1993) Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Intern. Rev. Immunol.* 10, 65-86
- Skerka, C., Hellwage, J., Weber, W., Tilkorn, A., Buck, F., Marti, T., Kampen, E., Beisiegel, U., and Zipfel, P.F. (1997) The human factor H related protein 4 (FHR-4). *J. Biol. Chem.* 272, 5627-5634

- Skerka, C., Kuhn, S., Gunther, K., Lingelbach, K., and Zipfel, P.F. (1993) A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H. *J. Biol. Chem.* 268, 2904-2908
- Skerka, C., Moulds, J.M., Taillon-Miller, P., Hourcade, D., Zipfel, P.F. (1995) The human factor H-related gene 2 (FHR2): gene structure and linkage to the coagulation factor XIIIb gene. *Immunogenetics* 42, 268-274
- Skerka, C., Horstmann, R.D., and Zipfel, P.F. (1991) Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J. Biol. Chem.* 266, 12015-12020
- Slater, G. W., Rousseau, J., and Noolandi, J. (1987) On stretching of DNA in the reptation theories of gel electrophoresis. *Biopolymers* 26, 863-72
- Soames, J.C., and Sim, R., (1997) Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b. *Biochem. J.* 326, 553-561
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNS fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- Sumiya, M., and Summerfield, J.A. (1997) The role of collectins in host defence. *Semin. Liver Dis.* 17, 311-318
- Timmann, C., Leippe, M., and Horstmann, R.D. (1991) Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J. Immunol.* 146, 1265-1270
- Tonks, N.K. (1990) Protein phosphatases: key players in the regulation of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 1114-1124
- Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H., and Walsh, K.A. (1988) Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 27, 8695-8701
- Turecki, G., Smith, M.A., and Mari, J.J. (1995) Type I bipolar disorder associated with a fragile site on chromosome 1. *Am. J. Med. Genet.* 60, 179-182
- van den Dobbelen, M.E., Verhasselt, V., Kaaskoek, J.G., Timmerman, J.J., Schroeijers, W.E., Verweij, C.L., van der Woude, F.J., van Es, L.A., and Daha, M.R. (1994) Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 95, 173-180
- Vasselon, T., Pironkova, R., and Detmers, P.A. (1997) Sensitive responses of leukocytes to lipopolysaccharide require a protein distinct from CD14 at the cell surface. *J. Immunol.* 159, 4498-4505
- Vastag, M., Skopal, J., Kramer, J., Kolev, K., Voko, Z., Csonka, E., Machovich, R., and Nagy, Z. (1998) Endothelial cells cultured from human brain microvessels produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor, and C4. *Immunobiol.* 199, 5-13
- Vedeler, C., Ulvestad, E., Borge, L., Conti, G., Williams, K., Mork, S., and Matre, R. (1994) The expression of CD59 in normal human nervous tissue. *Immunology* 82, 542-547
- Vetvicka, V., Reed, W., Hoover, M.L., and Ross, G.D. (1993) Complement factors H and I synthesized by B cell lines function to generate a growth factor activity from C3. *J. Immunol.* 150, 4052-4060
- Vik, D.P., Keeney, J.B., Munoz-Canoves, P., Chaplin, D.D., and Tack, B.F. (1988) Structure of the murine complement factor H gene. *J. Biol. Chem.* 263, 16720-16724
- Vik, D.P., Munoz-Canoves, P., Kozono, H., Martin, L.G., Tack, B.F., and Chaplin, D.D. (1990) Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in the mouse liver. *J. Biol. Chem.* 265, 193-201

- Volonakis, J.E. (1995) Transcriptional regulation of complement genes. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 277-305
- Walker, D.G., and McGeer, P.L. (1992) Complement gene expression in human brain: comparison between normal and Alzheimer disease cases. *Mol. Brain. Res.* 14, 109-116
- Ward, H.M., Higgs, N.H., Blackmore, T.K., Sadlon, T.A., and Gordon, D.L. (1997) Cloning and analysis of the human complement factor H gene promoter. *Immunol. Cell. Biol.* 75, 508-510
- Warwicker, P., Goodship, T.H.J., Donne, R.L., Pirson, Y., Nicholls, A., Ward, R.M., Turnpenny, P., and Goodship, J.A. (1998) *Kidney International* 53, 836-844
- Watts, M.J., Dankert, J.R., and Morgan, E.P. (1990) Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. *Biochem. J.* 265, 471-477
- Whaley, K. (1980) Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* 151, 501-516
- Williams, S.A., and Vik, D.P. (1997) Characterization of the 5' flanking region of the human complement factor H gene. *Scand. J. Immunol.* 45, 7-15
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Roopra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Sims, M., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonnhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J., and Wohldman, P. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38
- Xin, J., Azumi, K., Sasaki, M., and Nonaka, M. (1997) Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6340-6345
- Zalman, L.S., Wood, L.M., and Muller-Eberhard, H.J. (1986) Isolation of a human erythrocyte membrane protein capable of inhibiting expression of homologous complement transmembrane channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6975-6979
- Zalman, L.S., Brothers, M.A., Chiu, F.J., and Muller-Eberhard (1986) Mechanism of cytotoxicity of human large granular lymphocytes: relationship of the cytotoxic lymphocyte protein to the ninth complement component (C9) of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5262-5266
- Zhao, B., and Schwartz, J. (1998) Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological disease: recent progress and perspectives. *J. Neurosci. Res.* 52, 7-16
- Zipfel, P.F., Kemper, C., Dahmen, A., and Gigli, I. (1996) Cloning and recombinant expression of a barred sand bass (*Parablax nebulifer*) cDNA: The encoded protein displays structural homology and immunological crossreactivity to human complement/cofactor related plasma proteins. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 407-416
- Zipfel, P.F., and Skerka, C. (1999) FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol. Today* 20, 135-140
- Zipfel, P.F., and Skerka, C. (1994) Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol. Today* 15, 121-126

9 ANHANG

Direkte Sequenzierung des PCR-Amplifikats SCR 16s/ SCR 17as des YAC-Klons C2 und der BAC-Klone M12 und P20

HF1 SCR 16s TCTCCACCTGAGATTTCTCATGGTGTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAG
 C2 SCR 16s -----
 M12 SCR 16s -----
 P20 SCR 16s -----

HF1 SCR 16s TATGGAGAAGAAGTTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTGGAATTGATGGGCCT
 C2 SCR 16s
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

HF1 SCR 16s GCAATTGCAAAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCCCTCCATCATGCATAA
 C2 SCR 16s
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

SCR 17

HF1 SCR 16s AAACAGATTGTCTC-----
 C2 SCR 16sGTATGGTGCATTGAATTTTATTATATGTATGATAAA
 M12 SCR 16sGTATGGTGCATTGAA.....
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s ATTCTTCATTCAAAGTGTAAGTGGTACCAATAAGAAAGTAAACAGGGACTC
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s TAGAAATTCATAAGGTTTTCTTGAATATTCTGGACTGCTGTGGGAAATTA
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s TAGCTGTAGTAATTA AACATTTGACATTATAAGCCAAATTAGTTCATTT
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s TTCACATCATCTTGTGTGAACTTTAAGCATCCTCTGATGTATATTCTCAG
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s ACTTCTCATCTCTGTTCTTAGGGCACAGCTGCCTCTACTCATCAATCTCC
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

C2 SCR 16s ACATTATTCAATCTTCTGTCAGTTTATCAACAATCTGCCTATAA
 M12 SCR 16s
 P20 SCR 16s

HF1 SCR 17as TGTTACATTTCTGGCTCCATCCATTTTGTAAATATGTTGCACAAGTGTAAGTC
 C2 SCR 17as -----
 M12 SCR 17as -----
 P20 SCR 17as -----

HF1 SCR 17as ACTTGCTCACCCGCCTTATACACATCCTTCTTCTCTCCCATGGGTATGGCA
 C2 SCR 17as
 M12 SCR 17as
 P20 SCR 17as

```

SCR16/Intron
HF1 SCR 17as TTTTCAAAGCTAGGTAAACTGAGACAATCTGTTTTTATAA-----
C2 SCR 17as .....CTGATAGGAAAAAT
M12 SCR 17as .....CTGA.....
P20 SCR 17as .....CTGA.....

C2 SCR 17as ATGTATTTGTNCCGCAAATCTTTAAAAATAGGTTACATAACAATACATG
M12 SCR 17as .....N.....
P20 SCR 17as .....N.....

C2 SCR 17as TAATGGATTCTAAAATAGCGATATGTAAAATCAATGAATACTGTACAA
M12 SCR 17as .....A.....
P20 SCR 17as .....A.....

C2 SCR 17as CATTTTCCTTATAACTTGAGAAAATATATTAGCCATTTTGTCTTAATT
M12 SCR 17as .....
P20 SCR 17as .....G...A.....

C2 SCR 17as ACATTAAATCCTTCTAAATCTATTAAAAATACAAGATAGAAATGATAT
M12 SCR 17as .....
P20 SCR 17as .....-----

C2 SCR 17as TAGAAGACTGAAGAAATATTGGTAGCCGTAGCAATTGAGATTACACAT
M12 SCR 17as .....
P20 SCR 17as .....-----

C2 SCR 17as TTTTGGTTCACATTATTTTGTCCATACTTGCCACCTGATATGGTTAG
M12 SCR 17as .....
P20 SCR 17as .....-----

C2 SCR 17as GCTTTGTGTCCTCCCCCAATCTCATCTTGAATAATAATCTCCAGGGTGTGAA
M12 SCR 17as .....A.....
P20 SCR 17as .....-----

```

N: nicht lesbare Base

Die Sequenzen von C2, M12 und P20 stimmen mit der HF1 cDNS-Sequenz im Bereich des Exons überein.
Im Intron 16 gibt es zwischen den Klonen C2, M12 und P20 einzelne Austausche, die entweder auf Polymerasefehler oder Sequenzpolymorphismen hinweisen können.

Direkte Sequenzierung der PCR-Produkte SCR 6s/7as

			Intron
HF1	SCR	6s	TTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGTAAGTAAACTC
HF4	SCR	1A....G....A.....T.....-----
A8	SCR	6s	-----.....N.....NNCTC
C2	SCR	6s	-----.....
BA8	SCR	6s	-----..G.....T.....
B20	SCR	6s	NICHT LESBAR
M12	SCR	6s	-----...A.....T.....T.CTC
P20	SCR	6s	-----..G....A.....T.....-T.C.
HF1	SCR	6s	TGAACTGCTATATATATGTATAAACTTTCAAAGATCGAAGAAAGGAGAGCACATAA
A8	SCR	6s	N.....CN..N....C.....N..NN.N..NN..C..N.....
C2	SCR	6s
BA8	SCR	6s	..G..A..C...--.....T....G.....
M12	SCR	6sC.C.--.....N....TA...G.....
P20	SCR	6sC.C.--.....A....TA...G.....
HF1	SCR	6s	GTGATTACACCTGTCTTATGTAAACAGAAATAGGGCCAAGAAAAGAGTTGTTCAAGCA
A8	SCR	6s	N...C..N.....N..C.....N.....N.....
C2	SCR	6s
BA8	SCR	6sT..A.....
M12	SCR	6s	T.....T.T.....T.....
P20	SCR	6s	T.....T.T.....T.....
HF1	SCR	6s	AAGTGACCAAATAGATCTTTCTATTATGAGGATTTCTTCTTGAAAATCACAGGAGA
A8	SCR	6s	.NN.....
C2	SCR	6s
BA8	SCR	6s	..A.....T.C.-----
P20	SCR	6s	..A.....N.....-----
HF1	SCR	6s	AATAAATATAGGGACTTTATGAGAATATCTATATAATTTATAACATCTATTAATTATAA
A8	SCR	6s
C2	SCR	6sN.....
HF1	SCR	6s	AAAGTAAAGATAAGTAATATTGAATATTGATATTTCTTTTTGTGCAAACCTTTGTTA
A8	SCR	6sC.....
C2	SCR	6sC.....
HF1	SCR	6s	GTAACCTTAGTTCGTCTTCAGTTATAACATTATTTTGGATGTTTATGCAATCTT
A8	SCR	6s
C2	SCR	6sN.....
HF1	SCR	6s	ATTTAAATATTGTAAAAATAATTGTAATATACTATTTTGAGCAAATTTATGTTTC
A8	SCR	6s
C2	SCR	6sG.....N.....CN.....N..
			Exon 7 HF1/ 2 HF4
HF1	SCR	6s	TCATTTACTTTATTTATTTATCATTGTTATGGTCCTTAGGAAAATGTTATTTTCCTTA
HF4	SCR	2	-----A.....
A8	SCR	6sN.....N.....
C2	SCR	6s	...N.....N.....CGNN.....

SCR 6-7 TATACATCTATTAATTATAAAAAGTAAAGATAAGTAATATTGAATATTGAT
A8 SCR 7asNN.....C.....N.C.....
C2 SCR 7asNN.CG.....C.....N.C.....NG.....
B A8 SCR 7as -----
M12 SCR 7as -----
P20 SCR 7asA.T.....CG...C.....G.....N.....N..C.....

SCR 6-7 ATTTCTTTTTGTGCAAACCTTTGTTAGTAACTTTAGTTCGTCTTCAGTTATAC
A8 SCR 7as ..N.....NN..C.....
C2 SCR 7asN.NC.....
B A8 SCR 7asC...A...NCN.....T.....A.A.....
M12 SCR 7asC.C...A-.....T..G...A.AC.A...G...
P20 SCR 7asC.C...A-.....T..G...A.AC.A...G...

SCR 6-7 ATTATTTTTGGATGTTTATGCAATCTTATTTAAATATTGTAAAAATAATTGTA
A8 SCR 7as
C2 SCR 7asTCC.....C.....
B A8 SCR 7as ...G.....G.....C.....T.....
M12 SCR 7asG.....G...C.....T..
P20 SCR 7asG.....G...C.....T..

SCR 6-7 ATATACTATTTTTGAGCAAATTTATGTTTCTCATTACTTTATTTATTTATCAT
A8 SCR 7as
C2 SCR 7as ..-G..N.....G.....NA.....
B A8 SCR 7asC...T..AG.....C.....
M12 SCR 7asT...T.....
P20 SCR 7as--.....T.....

SCR 6-7 TGTTATGGTCCTTAGGAAAATGTTATTTTCCTTATTTGGAAAATGGATATAAT
HF4 -----
A8 SCR 7asN.....
C2 SCR 7as AT.....CC.....A...N..N.....
B A8 SCR 7asC.....CG.....C.....
M12 SCR 7as ..C...-.....
P20 SCR 7as ..C...-.....N.....

SCR 6-7 CAAAATCATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCC
HF4T.....C...C..A.....
A8 SCR 7asT.....
C2 SCR 7as .T.NCNT.....T.....
B A8 SCR 7as G....T.C.....C...GC...A..A...A--
M12 SCR 7asT.....C...C..A.....
P20 SCR 7asT.....C...C..A.....

SCR 6-7 ATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCG---CAGACCACAGT
HF4G.....TCCGT.....
A8 SCR 7as
C2 SCR 7asN.....
M12 SCR 7asG.....
P20 SCR 7asG.....

N: nicht lesbare Base

Die BAC-Klone P20, M12, A8 tragen das HF4-Gen, YAC C2 das HF1-Gen und YAC A8 beide Gene. Bei diesem Klon sind deshalb viele Basen nicht lesbar.

Sequenziererergebnisse der PCR-Amplifikate: HF1 SCR 10s/11as

```

Exon SCR 10
HF1 cDNS      TTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGCAAACCAGGATTTACAATAGTTGGAC
A8 SCR 10s    .....
C2 SCR 10s    .....
B20 SCR 10s   .....C..T..G.....T

HF1 cDNS      CTAATTCCGTTTCAGTGCTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATAT
A8 SCR 10s    .....
C2 SCR 10s    .....
B20 SCR 10s   .AG.C..A.....A..T.....A.....G.G...A..A..T.T....C..

Intron
HF1 cDNS      GTAAAGAGCA-----
A8 SCR 10s    .....GTGAATGCTTATCTTACAATTGCTGAAATAAGAATTAGAACTTTG
C2 SCR 10s    .....GTGA.....
B20 SCR 10s   .C....GTCAG.AT....T...G.....AN....C.....T..TT...A

A8 SCR 10s    AATACCAACTTTTTTCTTATTAATTTTGTGGGCTCCCATTGC-CTGTAACT
C2 SCR 10s    .....
B20 SCR 10s   NAATAATGCCCATATATTTTTATTGGAGCTTATATTACATCTATAATCTGAC

A8 SCR 10s    AATGAATTAAGTCAAATATTTGCCTGTGAAAGACATGTATTGAGTACTGAA
C2 SCR 10s    .....
B20 SCR 10s   AAAGTGGTAAAATGGCAAAGGAGAAAGGATGCAGTTCTATAGTTAATTGAGC

A8 SCR 10s    TACCTGAGATTCAGTCACTTAAGTTAATCTCCACATGGTTCTTGAACGATGT
C2 SCR 10s    .....
B20 SCR 10s   TGGCATAGATTATTTAGGTGTCCGTAATCAAGGAGTAATTCTACTTCTGTGT

YAC A8 11as   AAATCTTCCCATTTTACTGAACTTTTATATGTAAAACAGACAATTTACCCATTA
YAC C2 11as   .....T.....T.....G.....A.....
BAC B20 11as  ....T.AGTA.C.CC.---.....C...AC.T.T.-....C.....G.....

Exon SCR 11
HF1 SCR11     -----GAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAA
YAC A8 11as   TTTACATAGTATTTCTACTATA.....
YAC C2 11as   .....
BAC B20 11as  ....--.G..T.C.T..TA....GA.....G.....G.....C..

HF1 SCR 11    CTCCTCAATGGGAATGTTAAGGAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAG
YAC A8 11as   .....
YAC C2 11as   .....
BAC B20 11as  ...TC.....TG.A.....G.T..GA.....G.....A.....

HF1 SCR 11    TGGTGGAATATTATTGCAATCCTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAA
YAC A8 11as   .....
YAC C2 11as   .....
BAC B20 11as  .A.....G.....AT..A...A..C..G....----

```

Sequenzvergleich der subklonierten PCR-Produkte (amplifiziert mit den HF1-spezifischen Oligonukleotiden SCR10s/SCR11as) der YAC A8 und C2 und des BAC B20 im Vergleich mit der cDNS-Sequenz aus HF1. Die Amplifikate aus den YAC stimmen mit der HF1 cDNS-Sequenz überein, wogegen B20 stark abweicht.

Direkte Sequenzierung des PCR-Amplifikats SCR 1s/ SCR 2as der YAC-Klone A8, B2, F9, H5 und der BAC-Klone A8 und B20

```

HF2 SCR 1s ATGAAGAAAAATATAAGCCATTTTCCCAGGTTCTACAGGGGAAGTTTCTATTACT
HF3 SCR 1s .....A.....
A8 SCR 1s .....N.....
B2 SCR 1s .....A.....
F9 SCR 1s .....
H5 SCR 1s .....A.....
BA8 SCR 1s -----.....
B20 SCR 1s -----.....A.....

```

```

HF2 SCR 1s CCTGTGAATATAAATTTTGTGTCTCCTTCAAATCATTGACTCGCATAACATG
HF3 SCR 1s .....C.....G..
A8 SCR 1s .....C.....G..
B2 SCR 1s .....C.....G..
F9 SCR 1s .....C.....G..
H5 SCR 1s .....C.....G..
BA8 SCR 1s .....
B20 SCR 1s .....C.....G..

```

SCR 2/Intron

```

HF2 SCR 1s CACAGAAGAAGGATGGTCACCAACACCAAAGTGTCTCAGACTGTGTTT-----
HF3 SCR 1s .G.....A.....-----
A8 SCR 1s .G.....TGAGTAAATGCCCTG
B2 SCR 1s .G.....TGAGTAAATG....
F9 SCR 1s .G.....TGAGTAAATG....
H5 SCR 1s .G.....TGAGTAAATG....
BA8 SCR 1s .....T...
B20 SCR 1s .G.....

```

```

A8 SCR 1s TTCATTAAATGGATGTCATTTCAGTGAACAGAGAAGGATATGCCAGACAAGATCA
B2 SCR 1s .....A.....
F9 SCR 1s .....
H5 SCR 1s .....A.....
BA8 SCR 1s .....T.....
B20 SCR 1s .....A.....

```

```

A8 SCR 1s TAAGGTCTTGATAATCACAGGAACAGTGACCAGAGGAGCTGGAAAGATGGGAGA
B2 SCR 1s ...ACA.....G.....
F9 SCR 1s .....
H5 SCR 1s ...ACA.....G.....
BA8 SCR 1s .....A.A.....
B20 SCR 1s ...ACA.....G.....

```

```

A8 SCR 1s TGTAGTCCCCCTATTTTGAGATGGCTCCTATGAGAATCAATGAAGAATAAATATGT
B2 SCR 1s .....TT.....
F9 SCR 1s .....
H5 SCR 1s .....TT.....
BA8 SCR 1s .....A.....
B20 SCR 1s .....TT.....

```

```

A8 SCR 1s CANCTGTCTTGTGTTACCCGGAAATGCTCTACATGTTGAAATATATCAATTTTTT
B2 SCR 1s ..A.....CA.....T.....
F9 SCR 1s ..N.....
H5 SCR 1s ..A.....CA.....T.....
BA8 SCR 1s ..A.....T.....T.....G.....T.....
B20 SCR 1s ..A.....TG.....

```


A8 SCR 1s TAAACTGATCATTAATATATTTGACTGCTAATATTTCTTTACT
 B2 SCR 1sG.....
 F9 SCR 1s
 H5 SCR 1sG.....
 BA8 SCR 1sT.....
 B20 SCR 1sG.....

A8 SCR 2as TCAGCCTCCAGAGTAGCTGGAATTATAAGTGCGCACCACTATGCCCGCTAA
 B2 SCR 2as
 H5 SCR 2as
 F9 SCR 2as
 B A8 SCR 2asN.....N.....CN.....NN.....
 B20 SCR 2asN.....
 P20 SCR 2asN.....

A8 SCR 2as TTTTAGTATTTTTACTAGAAACAGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCNGGCCT
 B2 SCR 2asT...
 H5 SCR 2asT...
 F9 SCR 2asN...
 B A8 SCR 2asC.....A..T
 B20 SCR 2as ..N..C.....G.....A..T
 P20 SCR 2asT...

A8 SCR 2as CGAACTCATGGCCTCAANTGATCCACTCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCAGGG
 B2 SCR 2asA.....
 H5 SCR 2asA.....
 F9 SCR 2asN.....
 B A8 SCR 2as ..N..N..A.....G.....G.....N.....C.....A.
 B20 SCR 2asC.....G.....G.....C.....A.
 P20 SCR 2as

A8 SCR 2as ATTACCAGAGTGAGCCACTTCACCCGATTTATTAAAATATTTTAAAATGC
 B2 SCR 2asCT.....T.....
 H5 SCR 2asCT.....T.....
 F9 SCR 2as
 B A8 SCR 2asNNN.....
 B20 SCR 2asG.....
 P20 SCR 2asCT.....T.....

A8 SCR 2as AGTTGTACTTTTTCTTTGCTACTTCCATCTTGTACATTAATCCGTTTTTG
 B2 SCR 2asCT.....T.....
 H5 SCR 2asCT.....T.....
 F9 SCR 2as
 B A8 SCR 2asN.....
 B20 SCR 2as
 P20 SCR 2asCT.....T.....

HF2 SCR 2as -----ACTGTGTTTCTTTCCTTTTGTGGAAAA
 A8 SCR 2as GTCNTTAGG.....-----
 B2 SCR 2as ..T.....-----
 H5 SCR 2as ..T.....-----
 F9 SCR 2as ..C.....-----
 B A8 SCR 2as ..C.....-----
 B20 SCR 2as ..T.....-----
 P20 SCR 2as ..C.....-----

N: nicht lesbare Base

Mit den Oligonukleotiden SCR 1s/ SCR 2as amplifiziert man sowohl HF2- als auch HF3-Sequenzen. Sind beide Gene in der Ausgangs-DNS vorhanden (vgl. YAC A8, F9), dann erhält man bevorzugt die HF3-spezifische Sequenz bzw. nicht lesbare Basen an den Stellen der Sequenzunterschiede zwischen den Genen.

Die Klone B2, H5 und B20 tragen kein HF2-Gen, sie zeigen immer die HF3-spezifische Sequenz.

BAC A8 (BA8) zeigt immer die HF2-typische Sequenz, er trägt nur das HF2-Gen.

Direkte Sequenzierung des PCR-Amplifikats SCR 2s/ SCR 3as der YAC-Klone A8, F9 und des BAC-Klons A8

```

HF2 SCR 2s  TACTGTGCAAATTATTTGCAACACAGGATACAGACTTCAAAAACAATGAGAACAACATTTTC
A8 SCR 2s  -----.....
F9 SCR 2s  -----.....
BA8 SCR 2s  -----.....

                                                    SCR3/Intron
HF2 SCR 2s  ATGTGTAGAACGGGGCTGGTCCACCCCTCCCAAATGCAGGTCCACTGACACTTCCTGTGT
A8 SCR 2s  .....GTAAGTACA
F9 SCR 2s  .....GTAAGTACA
BA8 SCR 2s  .....GTAAGTACA

A8 SCR 2s  ATGCTGTTCTCTCATATGCTGTTATCTATTATAAAGTTTAAGAGAAATAAATCTTTTT
F9 SCR 2s  ATGC.....
BA8 SCR 2s  ATGC.....G.....

A8 SCR 2s  TACAGGTTAAATATAGGTTTTGCCACATACTTTTATCATTATTCATTTGATTTT
F9 SCR 2s  .....
BA8 SCR 2s  .....T.....

A8 SCR 2s  CAGTTCCAATTGTGCCAAGTGGATGTTGAATAACATAGTTTGCCTACCTATATA
F9 SCR 2s  .....
BA8 SCR 2s  .....

A8 SCR 2s  AATCAAATGTTCTCAAAGTGTGGTCGCTAAACCGGTAGCATCATCATCTTCTTG
F9 SCR 2s  .....
BA8 SCR 2s  .....C.....

A8 SCR 2s  GAGATTGTTTGAAATGAAAATACAATTCCATAAGCTCATTCTAGACACACGGAA
F9 SCR 2s  .....
BA8 SCR 2s  .....

A8 SCR 2s  TCAAAAATGTC
F9 SCR 2s  .....
BA8 SCR 2s  .....

YAC A8 3as  ATTTTATAAATTAATGTTAAATAAAATAGAACTGGTAATATTTGTTCTAACTCAAACCTCA
YAC F9 3as  .....
BAC A8 3as  .....TA.CTCA.....

YAC A8 3as  AAGAGAGATATCCAGGAAAACCTTTCGTTTACACTGGCTTCCAGAAGGGAAAAATAAAGG
YAC F9 3as  .....
BAC A8 3as  .....

YAC A8 3as  TCTATCAGTGTCTTAGCGAAGGATGAAGAAGAAATTTAAAACATCAAAGCTTGTACCTG
YAC F9 3as  .....
BAC A8 3as  .....

YAC A8 3as  ACAAAAAATAGTTTCATGTCTTTTCCTCAATATTACATTTAAATTTATTAAAATCAACN
YAC F9 3as  .....
BAC A8 3as  .....T.....

YAC A8 3as  AAATATTTGATGAGNTTGTCTACTTATTTTAAATTCGTCTTGAAATATATTTGTAACCTG
YAC F9 3as  .....
BAC A8 3as  .....C.....

YAC A8 3as  TATTAGTTGATTTGCTACTCAAAAATGAACACTAGGTGGAACCACTTCTTTTTTTT

```

YAC F9 3as
 BAC A8 3as

Exon SCR3

HF2a -----ACACTTCCTGTGTGAATCCGCCACAGTACAAAATGCTTATATAGT
 YAC A8 3as TCTACTCAG.....
 YAC F9 3as
 BAC A8 3asC.....C.

HF2 GTCGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAGAGAGTACGTTATCAATGTAGGA
 YAC A8 3as
 YAC F9 3as
 BAC A8 3asG.....

HF2a GCCCT-TATGAAATGTTTGGG
 YAC A8 3asC.....
 YAC F9 3asC.....
 BAC A8 3asC.....

Die Amplifikate der YAC-Klone entsprechen dem HF2a-Allel, BAC A8 dem HF2b-Allel. Abweichend zur angegebenen HF2a-Sequenz, tragen alle YAC und der BAC-Klon eine Insertion einer Base (C) im SCR3-Exon. Die Unterschiede im Intronbereich zwischen YAC- und BAC-Sequenzen sind wahrscheinlich auf Sequenzunterschiede der HF2-Allele zurückzuführen.

Sequenzierung des PCR-Produkts: HF2 L-s - SCR1 as

HF2 Signalpeptid L-s

```

HF2      TATCTGCAGCATGTGGCTCCTGGTCAGTGTAATTCTAATCTCACGGATATCCTCTGTTG
HF3      .....
6000.11 .....
6000.14 .....
    
```

Intron

```

HF2      GGGGAGAAG-----
HF3      .....
6000.11 .....GTAAGTTCAAAAACAGACCTGAATATTTAGTTCCTTTTTCAGATACATTT
6000.14 .....
    
```

```

6000.11 ATCGGTTTTTGTGTGTATGCTTACATATT
6000.14 .....
    
```

SCR 1as

```

HF2a cDNS  AGATTGGAAC TACCAAGCATGTGGCTCCTGGTCAGTGTAATTCTAATCTCACGGA
HF3 cDNS   -----..T.....
6000.11   -----..T.....
6000.14   -----..T.....
    
```

```

HF2a cDNS  TATCCTCTGTTGGGGGAGAAGCAACATTTTGTGATTTTCCAAAAATAAACCATGG
HF3 cDNS   .....TG..C.....
6000.11   .....TG..C.....
6000.14   .....
    
```

```

HF2a cDNS  AATTCTATATGATGAAGAAAAATATAAGCCATTTTCCCAGGTTT
HF3 cDNS   .....
6000.11   .....
6000.14   .....
    
```

Mit den ursprünglich zur Amplifikation von HF2-Sequenzen ausgesuchten Oligonukleotidpaar, erhält man ein 6000 bp großes Amplifikat des 5'UT-Genabschnitts von HF3.

Sequenzierergebnis der Oligonukleotide HF2 L-s/SCR1as mit YAC C2

PCP-2 cDNS TGAGGCCCTGTGGCTCCTGGTCAGGCTGCCCGTTGTGGGGAGGGGCAGTG
 C2 Klon 1 TCTGCAGCA.....
 C2 Klon 2 TCTGCAGCA.....

PCP-2 cDNS TTAGAGCAGGGCTGGTCATACCCTCTGGAGTTCAGAGCAAGAGGTAGGACC
 C2 Klon 1G.....
 C2 Klon 2G.....

PCP-2 cDNS AGTGCTTTTTTGTTCCTTTTGTATTATTTTGGTTGGGTGGGTGGGAAGGTCT
 C2 Klon 1
 C2 Klon 2
 C2 Klon 2

PCP-2 cDNS CTTTAAAATGGGGCAGGCCACACCCCATTCCTGCCTCAATTTCCCCATC
 C2 Klon 1
 C2 Klon 2

PCP-2 cDNS TGTAAGCTGTAGATATGACTACTGACCTACCTCGCAGGGGGCTGTGGGGAG
 C2 Klon 1
 C2 Klon 2

PCP-2 cDNS GCATAAGCTGATGTTTGTAAAGCGCTTTGTAAATAAACGTGCTCTCTGAAT
 C2 Klon 1
 C2 Klon 2

PCP-2 cDNS GCCAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
 Klon 1CAGAGCAGCCCTGTGTGTGTCTCACCAGCCTGACGGGGCCTGCTCAC
 Klon 2

Sequenzierungsergebnisse HF4/HF5 SCR 4s/5as der Klone C2 (YAC) und B20 (BAC)

```

HF4 SCR 4   AGCAATGGTGATACCACCTCCTTTCTACTAAAAGTGTATGTGCCACAGTCAAGAGT
HF5 SCR 4   .....
C2 SCR 4s   -----.....
B20 SCR 4s   -----.....

HF4 SCR 4   CGAGTACCAATGCCAGTCCTACTATGAACTTCAGGGTTCTAATTATGTAACATGTA
HF5 SCR 4   .....
C2 SCR 4s   .....
B20 SCR 4s   .....

                                           Intron
HF 4 SCR4   GTAATGGAGAGTGGTCGGCACCACCTAGATGCATACATCCA-----
HF5 SCR 4   .....A.....A.....-----
C2 SCR 4s   .....A.....A.....GTAAGTTCTTAAAATTCT
B20 SCR 4s   .....A.....A.....GTAAG.....

C2 SCR 4s   ANATCCTGA-----
B20 SCR 4s   .G.....GAAAATCAGAGTAATAAGTTTGATATTTGCTTTTTTATACTAGAA

B20 SCR 4s   TTTTATGGGTTATTACCCTAGAACTGTGTTTCAACAGCTATTCTGC

C2 SCR 5as  AAATGTTAAAGTCAGTATGTAGCACAAATTAATAACTATTAACATCTGGACTA
B20 SCR 5as  -----

C2 SCR 5as  TTCTANAATTCTATTTTATCCTAAACTACTCATTAGGATGCATTGTATCTGCTC
B20 SCR 5as  ---.....

                                           Exon
HF4 SCR5    -----ATCCATGT
HF5 SCR5    -----
C2 SCR 5as  TAGAAAGGCAAGATTATGATTGCTAACCTTCTTTTTCTGCTTTCAG.....
B20 SCR 5as  .....G...N.....

HF4 SCR5    ATAATAACTGAAGAAAACATG
HF5 SCR5    .....
C2 SCR 5as  .....
B20 SCR 5as  .....

```

N: nicht lesbare Base

Die Amplifikate aus B20 und C2 stammen vom HF5-Gen.

EIN DANKESCHÖN AN:

- Frau Prof. Elisabeth Weiss für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung der Dissertation.
- PhD. Matthew Sprinks für die Unterweisung in die PFGE und die Diskussionsbereitschaft in »unserem« YAC-Lab.
- Dr. Michael Speicher für die Durchführung der FISH-Tests.
- Dr. Anil Jain für die Hilfe beim Layout und bei Computerproblemen.
- Allen Mitarbeitern im Labor, vorallem Sabine Maier, Matthias Ulbrecht, Valeska Hofmeister und Eve Holtorf für die angenehme Arbeitsathmosphäre und die Entspannung beim gemeinsamen Teetrinken.

LEBENS LAUF

ASTRID CANNICH

Name: Astrid Cannich

Adresse: Marbachstrasse 12
81369 München

Geburtsort und -datum: Rodewisch (ehemalige DDR)
29. November 1967

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ehestand: ledig

AUSBILDUNG

1974-79 Allgemeine Oberschule, Ellefeld (ehemalige DDR)

1980-89 Deutschherren-Gymnasium, Aichach

1989-94 Biologiestudium (Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Biochemie, Immunologie, Humangenetik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Diplomarbeit: »Organisation und Expression von Faktor H und der Faktor H verwandten Gene.« am Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU, München
Betreuerin: Prof. E.H. Weiss

Feb. 95-Mai. 99 Doktorarbeit: »Die Komplement Faktor H-Genfamilie: Organisation, Struktur und Expression.« am Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU, München
Betreuerin: Prof. E.H. Weiss

ERKLÄRUNG:

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorgelegte Doktorarbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, Mai 1999

Astrid Cannich