

# Zur molekularen Analyse der Struktur und der Evolution des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Ratte

Lutz Walter

Deutsches Primatenzentrum,  
Göttingen



## Zur Person

Lutz Walter, geb. 1962 in Northeim. 1981 bis 1985 Zeitsoldat bei der Bundeswehr. 1985 bis 1992 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen. 1992 Diplom im Fach Biologie; Thema der Diplomarbeit „Charakterisierung von Klasse-I-cDNA-Klonen des MHC der Ratte“. 1992 - 1994 Dissertation über das Thema „Molekulargenetische Analyse eines neuen Gens, Tegt“ in der Abteilung Immungenetik der Universität Göttingen (Prof. Dr. E. Günther). 1994 Promotion zum Dr. rer. nat. 1994 - 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter und von 1999 - 2004 Wissenschaftlicher Assistent (C1) in der Abteilung Immungenetik der Universität Göttingen. Seit 2004 Leiter der Forschergruppe Primatengenetik am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen. Projektleiter im EU-Projekt „Rat Genome Mapping“ (BI04-CT96-0562), im GRK 289 „Perspektiven der Primatologie: Integration genetischer, neurobiologischer und ethologischer Forschungsansätze“ und im Projekt „Exploring the world of non-messenger RNAs“ (NGFN-2). 2005 Habilitation für das Fach „Immunologie und Immungenetik“ an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen mit dem Thema „Molekulare Analysen der genomischen Struktur und der Evolution des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Ratte“ (Nach dem Tod von Prof. Günther betreut durch Prof. Dr. W. Engel, Institut für Humangenetik der Universität Göttingen).

## Zusammenfassung der Habilitation

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Säuger spielt eine ausschlaggebende Rolle beim Zustandekommen einer Immunantwort. Dies ist vor allem auf die im MHC-kodierten Klasse-I- bzw. Klasse-II-Moleküle zurückzuführen, die den T-Lymphozyten Peptide präsentieren. Ein besonderes Charakteristikum der klassischen Klasse-I- und Klasse-II-Gene ist ihr außerordentlicher Polymorphismus, der die üblicherweise zu beobachtende Histoinkompatibilität bei Transplantationen determiniert. Darüber hinaus ist der MHC mit vielen – im Wesentlichen immunologischen – Krankheiten assoziiert, wie z. B. Infektions- und Autoimmunerkrankungen. Die Ratte dient in vielen Fällen als Modell für die Erforschung solcher Krankheiten. Daher ist eine solide genomische Kenntnis des Ratten-MHC, des so genannten RT1-Komplexes, notwendig für entsprechende Untersuchungen MHC-assoziiierter Erkrankungen unter Nutzung von Ratten-Modellen, in denen eine Beteiligung der einzelnen MHC-Gene analysiert werden soll.

## Physikalische Kartierung und Evolution der zentromerischen MHC-Klasse-I-Region der Ratte

Erste Hinweise auf eine genetische Kontrolle der Abstoßung transplantierten Gewebes wurden am Anfang des letzten Jahrhunderts von Ernest Tyzzer und Clarence Little durch Untersuchungen an Mäusen erhalten. Die eigentliche Entdeckung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) wird Peter Gorer zugespro-

chen, der 1936 zeigen konnte, dass die Toleranz bzw. die Abstoßung von transplantiertem Tumorgewebe zwischen verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen von der Ab- bzw. Anwesenheit bestimmter Antigene abhängt, die 1950 von George Snell mithilfe congenener Mausstämmen als starke bzw. schwache Histokompatibilitätsantigene charakterisiert wurden. Nach der Entdeckung ähnlicher Genkomplexe in anderen Organismen wie Hühnchen (1950), Mensch (1958) und Ratte (1960) wurde der allgemeine Begriff *major histocompatibility complex* (MHC) verwendet.

Der MHC in Säugern umfasst ca. 4 Mb und wird nach Übereinkunft in drei Regionen eingeteilt, die als Klasse-I-, Klasse-II- und Klasse-III (oder auch zentrale)-Region bezeichnet werden. In der Klasse-I- bzw. der Klasse-II-Region befinden sich die für den MHC so charakteristischen Klasse-I- bzw. Klasse-II-Gene, während die Gene der Klasse-III-Region keiner dominierenden Klasse angehören. Alle MHC-Gene, die nicht der Klasse-I- oder der Klasse-II-Familie angehören, werden auch als so genannte Ankergene (oder *framework genes*) bezeichnet. Die Klasse-I- und Klasse-II-Gene zeichnen sich zum einen dadurch aus, dass sie multigenisch sind – also Genfamilien bilden – und zum anderen durch ihren ausgeprägten Polymorphismus (multiple Allelie) innerhalb einer Population.

Maus und Ratte zeigen im Vergleich zu anderen Säugern eine strukturelle Besonderheit im MHC: sie besitzen

eine Klasse-I-Gen-tragende Region zentromerwärts der Klasse-II-Region zwischen den Genen *Sacm2l* und *Ring1*, die in der Maus als H2-K- und in der Ratte als RT1-A-Region bezeichnet wird. Neben der physikalischen Kartierung dieser MHC-Region der Ratte wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob die H-2K- und die RT1-A-Region einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung haben oder unabhängig voneinander in Maus und Ratte entstanden sind. Neben einer detaillierten Genkarte war auch die genaue Anzahl der in der RT1-A-Region enthaltenen Klasse-I-Gene noch unbekannt gewesen. In dem von uns erstellten Kontig aus überlappenden PAC-Klonen, die aus der BN-Ratte (RT1<sup>n</sup>) gewonnen worden waren, konnten drei Klasse-I-Gene in der RT1-A-Region detektiert werden, die als RT1-A1<sup>n</sup>, RT1-A2<sup>n</sup> und RT1-A3<sup>n</sup> identifiziert wurden. Bei RT1-A1 und RT1-A2 handelt es sich um klassische Klasse-I-Gene (Klasse-Ia), und durch Untersuchungen synonymmer (*d<sub>s</sub>*) und nichtsynonymer (*d<sub>n</sub>*) Nukleotidaustauschraten der Kodons der Antigen-bindenden Region konnte auch RT1-A3<sup>n</sup> als Klasse-Ia-Gen eingeordnet werden. Interessanterweise konnte aus einem anderen Ratteninzuchtstamm (SHRSP, RT1<sup>k</sup>-Haplotyp) ein YAC-Klon isoliert werden, der zwar die komplette RT1-A-Region, aber nur ein Klasse-I-Gen (RT1-A1<sup>k</sup>) enthält. Diese Daten zeigten zum ersten Mal anhand von physikalischen Karten, dass die Ratte – im Gegensatz zur Maus – eine Haplotyp-abhängige Anzahl von Klasse-I-Genen im zentromerischen Teil des MHC besitzt.

Für die Beantwortung der Frage, ob die Regionen RT1-A und H2-K ortholog sind, also einen gemeinsamen Ursprung in einer Vorläuferspezies von Ratte und Maus haben, eignen sich die Klasse-I-Gene selbst oftmals nicht gut, da sie in der Entwicklung der Spezies sehr rasch evolvieren und entsprechende orthologe Beziehungen nicht mehr nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurden die die Klasse-I-Gene flankierenden Bereiche der orthologen Gene *Sacm2l* und *Ring1* in Ratte, Maus und Mensch verglichen und auf einen Bruch in der

Homologie untersucht. Tatsächlich fanden sich zwei Homologie-Bruchpunkte, sowohl beim Vergleich Ratte-Mensch als auch bei Maus-Mensch. Diese Bruchpunkte wurden als diejenigen Punkte interpretiert, an denen die Klasse-I-Regionen zwischen den Genen *Sacm2l* und *Ring1* bei den Nagern inseriert wurden. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass die Insertionspunkte bei Ratte und Maus im Vergleich zum Menschen an der gleichen Stelle zu finden sind. Daraus wurde geschlossen, dass die Insertion wahrscheinlich in einem gemeinsamen Vorläufer von Ratte und Maus stattgefunden hat.

**Physikalische Kartierung und Expressionsprofil der Gene aus der telomerischen Klasse-I-Region des MHC der Ratte**

Die Analyse des Klonkontigs aus der telomerischen Klasse-I-Region (RT1-C/E/M) offenbarte eine vom Menschen und zum Teil von der Maus her bekannte und somit konservierte genomische Organisation: eine clusterartige Anordnung von Klasse-I-Genen, die an bestimmten Positionen zwischen den orthologen Ankergenen liegen. Interessanterweise zeigte sich, dass die Klasse-I-Gencluster der Ratte zwischen denselben Ankergenen liegen wie beim Menschen und – soweit bekannt – bei der Maus. Daraus ergibt sich der aus evolutionärer Sicht sehr interessante Befund, dass die Klasse-I-Gencluster zwar an identischen Positionen im MHC von Ratte und Mensch vorkommen – man könnte auch sagen an „orthologen“ Positionen – die Klasse-I-Gene selbst jedoch bekanntermassen paralog sind, d. h. nicht auf ein gemeinsames Vorläufergen zurückgehen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine Feinkartierung bereits bekannter RT1-Mikrosatellitenmarker vorzunehmen. Überraschenderweise konnten die jeweiligen einzelnen Marker auf mehreren nicht überlappenden PAC-Klonen nachgewiesen werden, so dass man von mehrfachen Duplikationen dieser Marker ausgehen muss. Dieser neue Befund ist wichtig für die Nutzbarkeit dieser Marker in so genannten *quantitative trait loci* (QTL)-Analysen, in denen das multiple Vor-

kommen unter Umständen zu falschen Schlussfolgerungen führen kann.

Einige der Gene in der telomeren Klasse-I-Region waren erst durch die komplette Sequenzierung des MHC im Menschen entdeckt worden. Aus diesem Grund gab es über die Expression dieser Gene zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen noch gar keine bzw. nur begrenzte Informationen, wie z. B. Angaben über cDNA-Quellen von *expressed sequence tags* (EST). Für die zukünftige Nutzbarkeit der genomischen Information des RT1-Komplexes in Krankheitsmodellen der Ratte ist es allerdings wichtig, sich einen Überblick über die Expression der entsprechenden Gene zu verschaffen. Anschließend können dann Expressionsmuster und Expressionsstärke der einzelnen Gene in unterschiedlichen Ratteninzuchtstämmen bestimmt und verglichen werden. Wir haben daher mithilfe von Northernblotanalysen Expressionsprofile der 26 Ankergene in verschiedenen Organen bzw. Geweben erstellt. Es zeigte sich, dass ca. ein Drittel dieser Gene in allen untersuchten Organen/Geweben exprimiert ist, während die restlichen ein differentielles Expressionsmuster aufwiesen bzw. deren Expression in den untersuchten Organen nicht nachweisbar war. Durch densitometrische Auswertung konnte die Expressionsstärke der Gene in den verschiedenen Organen/Geweben bestimmt werden, wobei sich z. T. größere Unterschiede ergaben. Eine weitere sehr aufschlussreiche Information, die durch den Northernblot geliefert wird, ist das Vorkommen alternativer Transkripte. Auch in diesem Punkt konnten deutliche Unterschiede in Bezug auf An- und Abwesenheit sowie Expressionsstärke alternativer Transkripte eines Gens in den verschiedenen Organen/Geweben detektiert werden. Hier wird sich in zukünftigen Untersuchungen zeigen müssen, ob sich Rattenstämme hinsichtlich der Anwesenheit oder der Expressionsstärke alternativer Transkripte in bestimmten Organen unterscheiden und ein kausaler Zusammenhang mit einer differentiellen Suszeptibilität gegenüber MHC-

assoziierten Erkrankungen in diesen Stämmen besteht.

### Physikalische Kartierung der Klasse-II- und Klasse-III-Regionen des MHC der Ratte

In der Klasse-II-Region, auch als RT1-B/D-Region bezeichnet, konnten alle bereits bekannten Klasse-II-Gene der Ratte detektiert werden und fanden sich im Vergleich zu Mensch und Maus an erwarteter Position und Reihenfolge. Somit konnten keine Abweichungen von der genomischen Organisation der Klasse-II-Region der Ratte von Mensch bzw. Maus festgestellt werden, was auf hohen Grad an Konserviertheit sowie relativ geringe Dynamik dieser MHC-Region hindeutet. Beim Vergleich der Klasse-III-Region von Ratte, Mensch und Maus konnte ein polymorpher Bereich zwischen den *Btnl*-Genen und *Notch4* ermittelt werden. Überraschenderweise wurden an dieser Stelle Kopien der Gene für den Komplementfaktor C4 (*C4*), die Serin/Threonin-Kinase 19 (*Stk19*) und die Steroid-21-Hydroxylase (*Cyp21*) entdeckt. Diese Gene bilden zusammen mit dem *Tnx*-Gen ein Modul, das bei Mensch und Maus in der Klasse-III-Region tandemartig dupliziert vorkommt. In der Ratte konnte zwar ebenfalls eine Duplikation des Moduls entdeckt werden, die genomische Organisation und Position des duplizierten Moduls ist in der Ratte im Vergleich zu Mensch und Maus jedoch sehr verschieden. Zum einen fehlt im duplizierten Modul das *Tnx*-Gen und zum anderen ist dieses nicht tandemartig angeordnet, sondern kartiert ca. 200 Kb centromerwärts an die Grenze zwischen Klasse-II- und Klasse-III-Region.

Von den Genen *C4*, *Cyp21* und *Stk19* sowie den entsprechenden Duplikaten konnten partielle genomische Sequenzen gewonnen werden, die – zusammen mit Sequenzen aus den homologen Genen aus Mensch und Maus – einer phylogenetischen Analyse unterzogen wurden. Dabei konnte eine speziesspezifische Gruppierung (*clustering*) bei allen drei Genen beobachtet werden. Dies deutet eher auf rezente, unabhängige Duplikationen der jeweiligen Module in Ratte, Mensch und Maus hin. Da ein spe-

ziesspezifisches *clustering* allerdings auch auf Homogenisierungen der beteiligten Gene zurückgeführt werden kann, was interessanterweise für *C4* und *CYP21* in Primaten beschrieben wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Modul in einem gemeinsamen Vorläufer dupliziert und in den Spezies beibehalten wurde, aber sekundären Veränderungen wie Homogenisierung oder Translokation unterlag.

### Genomische Sequenz und vergleichende Analyse des MHC der Ratte

Aus der erstellten Karte aus insgesamt 157 überlappenden Klonen des RT1-Komplexes wurden 41 ausgesucht, die eine minimale Überlappung aufwiesen (Minimalkontig), und für die komplette Sequenzierung verwendet. Die erstellte Sequenz umfasst 3.828.090 Bp, und somit hat der MHC der Ratte eine ähnliche Grösse wie der des Menschen. Insgesamt konnten in diesem Genomabschnitt 223 Gene (ohne prozessierte Pseudogene) festgestellt werden. Damit ergibt sich eine Dichte von 1 Gen pro 17,2 Kb. Es bestätigt sich, dass der MHC eine sehr gendichte Region des Säuger-genoms darstellt.

Im Vergleich mit den MHC-Sequenzen von Mensch und Maus zeigen sich längere Abschnitte mit großer Nukleotidhomologie, die vor allem auf die Ankergene zurückzuführen ist, wie z. B. ein konservierter Block von ca. 1 Mb, der die komplette Klasse-III-Region enthält. Es finden sich allerdings auch recht deutliche Unterschiede, die sich in der An- bzw. Abwesenheit gewisser Gene oder Typen von Genen äußern, und insbesondere bei Genfamilien (Klasse-I- und Olfaktorische Rezeptorgene) anzutreffen sind. Diese Unterschiede wurden anhand von phylogenetischen Stammbäumen näher analysiert. Die Olfaktorischen Rezeptor (OR)-Gene bilden mit mehr als 1000 Mitgliedern die größte Genfamilie bei Säugern, wovon sich einige am distalen Ende des MHC befinden. In der Literatur wird diskutiert, ob diese MHC-gekoppelten olfaktorischen Rezeptoren an der Detektion polymorpher MHC-Moleküle und damit an der geruchsbeeinflus-

sten Partnerwahl beteiligt sind. Polymorphe MHC-Moleküle spielen erwiesenermaßen bei Mäusen und Stichelingen, offensichtlich jedoch nicht bei Schafen eine Rolle bei der geruchsbeeinflussten Partnerwahl. Interessanterweise zeigt die phylogenetische Stammbaumanalyse mit den MHC-gekoppelten OR-Genen durchaus speziesspezifische Expansionen gewisser OR-Gene sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus, was auf rasche Evolution und funktionelle Diversifizierung hindeutet. Dies wäre mit einer Rolle bei der Detektion polymorpher MHC-Moleküle durchaus kompatibel.

In einer weiteren Stammbaumanalyse wurden die phylogenetischen Beziehungen der Klasse-I-Gene von Ratte und Maus näher untersucht. Auch in diesem Stammbaum konnten sowohl orthologe als auch paraloge Beziehungen festgestellt werden. Besonders auffällig ist die Paralogie bei den Genen, die in der RT1-A- und RT1-CE-Region in der Ratte und den korrespondierenden Regionen in der Maus (H2-K und H2-D/L/Q) vorkommen: RT1-A- und RT1-CE-kodierte Klasse-I-Gene zeigen grössere Ähnlichkeit zueinander als zu den Klasse-I-Genen der H2-K- bzw. H2-D/L/Q-Region. Der Grund dafür wird von einigen Forschern in einer *concerted evolution* gesehen, die durch Genkonversion zur Homogenisierung der Gensequenzen führt, während von anderen das *birth and death* Modell favorisiert wird, das von Duplikationen und Deletionen von Mitgliedern der Klasse-I-Genfamilie ausgeht. Die Analyse von Pseudogenen in den Klasse-I-Regionen der Ratte und der Maus lieferte präzisere Erkenntnisse darüber, welches der beiden Modelle für die Evolution der Klasse-I-Genregionen zutrifft. So finden sich in den Regionen RT1-A, RT1-CE, H2-K und H2-D/L/Q Fragmente des *Sacm2l*-Gens und des Pseudogens *LOC 224733*, die in einer Stammbaumanalyse sich jeweils speziesspezifisch gruppieren. Darüberhinaus fanden sich in den Regionen RT1-A und RT1-CE mehrere Kopien eines Pseudogens, *Cdk2ap1*, das in H2-K und H2-D/L/Q nicht vorkommt. Eine unabhängige Integration der *Cdk2ap1*-Kopien

in die RT1-A- bzw. RT1-CE-Region erscheint eher unwahrscheinlich, daher muss man annehmen, dass die RT1-A- und die RT1-CE-Region einen gemeinsamen Ursprung haben oder durch *unequal crossing-over* miteinander im Austausch stehen. Da bei Pseudogenen in der Regel eine neutrale Evolution angenommen wird, zeigt deren speziesspezifische Entwicklung einen unabhängigen Ursprung dieser Klasse-I-Regionen in Ratte und Maus an. Somit kommen diese Klasse-I-Regionen zwar an korrespondierenden Punkten des MHC in Ratte und Maus vor (s. o.), RT1-A und H2-K bzw. RT1-CE und H2-D/L/Q haben allerdings keinen gemeinsamen Ursprung. Die Amplifikation dieser verschiedenen Pseudogene in Ratte und Maus erfolgte sehr wahrscheinlich durch Duplikationen der eng benachbarten Klasse-I-Gene. Dieser Befund stützt daher das *birth and death* Modell der Evolution der verschiedenen Klasse-I-Regionen.

Nach dem HLA-System liegt mit dem RT1-Komplex nun der zweite MHC eines Säugers als komplette Sequenz vor. In der Maus gibt es bisher nur eine zusammengesetzte H2-Sequenz aus zwei Haplotypen mit einer Lücke in der H2-T-Region. Die Verfügbarkeit der MHC-Sequenzen bietet eine ausgezeichnete Basis für die Analyse MHC-assoziiierter Erkrankungen in entsprechenden Tiermodellen, da nun alle Gene des MHC bekannt sind und ihre potentielle Beteiligung an diesen Krankheiten gezielt überprüft werden kann.

**Literatur**

Walter L., Günther E. (2000). Physical mapping and evolution of the centromeric class I gene-containing region of the rat MHC. *Immunogenetics* 51: 829-837.

Ioannidu S., Walter L., Dressel R., Günther E. (2001). Physical map and expression profile of genes of the telomeric class I gene region of the rat MHC. *J Immunol* 166: 3957-3965.

Walter L., Hurt P., Himmelbauer H., Sudbrak R., Günther E. (2002). Physical mapping of the major histocompatibility complex class II and class III regions of the rat. *Immunogenetics* 54: 268-275.

Hurt P., Walter L., Sudbrak R., Klages S., Müller I., Shiina T., Inoko H., Lehrach H., Günther E., Reinhardt R., Himmelbauer H. (2004). The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Res* 14: 631-639.

**Korrespondenzadresse**

Priv.-Doz. Dr. Lutz Walter  
 Forschergruppe Primatengenetik  
 Deutsches Primatenzentrum  
 Kellnerweg 4  
 37077 Göttingen  
 Tel. +49-551-3851-161  
 Fax +49-551-3851-228  
 lwalter@gwdg.de