

Praktikumsbericht

Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön
Abteilung Evolutionsökologie

RSCA zur Typisierung von MHC-Allelen

21. August bis 20. September 2006

Christoph Heuser

1 Einführung

Nach dem Abitur und einer Zeit ohne feste Aufgabe hatte ich im Sommer 2006 die willkommene Möglichkeit, ein gut vierwöchiges Forschungs-praktikum am Max-Planck-Institut für Limnologie in Plön durchzuführen, also praktisch zu arbeiten und Motivation für die Theoriestunden im anstehenden Grundstudium der Molekularen Biomedizin zu sammeln.



Die Arbeit des Instituts beschränkt sich nicht - wie

es der Name vermuten lassen könnte - auf gewässerkundliche Themen, vielmehr bedient man sich dort verschiedener Modellorganismen aus dem Biotop Binnengewässer, um ökologische Vorgänge in den Abteilungen Ökophysiologie und Evolutionsökologie unter verschiedensten Blickwinkeln untersuchen zu können.

Während meiner Praktikumszeit war ich als ständiger Mitarbeiter von Tobias Lenz im Einsatz, der als Doktorand in einer Arbeitsgruppe der Abteilung Evolutionsökologie beschäftigt ist. Sein Aufgabengebiet ist derzeit die (Weiter-)Entwicklung einer Methode zur Typisierung von Stichlingen (bzw. allgemein von Wirbeltieren), dem wichtigsten Modellfisch der Abteilung, bezüglich bestimmter Immungene. Auf diese Gene, Gene für den MHC (Major Histocompatibility Complex), legt die Arbeitsgruppe ihr Hauptaugenmerk, weil er nicht nur in der Immunabwehr und damit für evolutionäre Aspekte, sondern auch bei der Partnerwahl entscheidend ist.

Diese Zusammenhänge sollen im nächsten Kapitel dargelegt werden, bevor ich im Anschluss verschiedene Typisierungsmethoden vorstelle und dann über meine Aufgaben berichte.

2 Was ist MHC?

Der MHC ist ein Zelloberflächenprotein (Klasse-I und -II) bei Wirbeltieren, das T-Zellen Antigene, z.B. von Krankheitserregern oder Parasiten, präsentiert, sodass eine Immunreaktion ausgelöst werden kann. Damit hat er entscheidende Bedeutung in der Immunabwehr.

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer großen, membrangebundenen und einer kleinen, löslichen Untereinheit und einem Peptid (Antigen), das ein Fragment eines in der Zelle synthetisierten Proteins ist. Dringen Krankheitserreger wie Bakterien oder Viren in Zellen ein, werden dort die körperfremden (Nicht-Selbst-)Proteine enzymatisch zersetzt, vom MHC-Klasse-I in der Bindungsgrube gebunden, an die Zelloberfläche transportiert und signalisieren T-Killerzellen (CD8+T-Zellen) den Befall. Gesunde Zellen, die nur körpereigene Peptide präsentieren, lösen bei T-Killerzellen keine Reaktion aus.¹

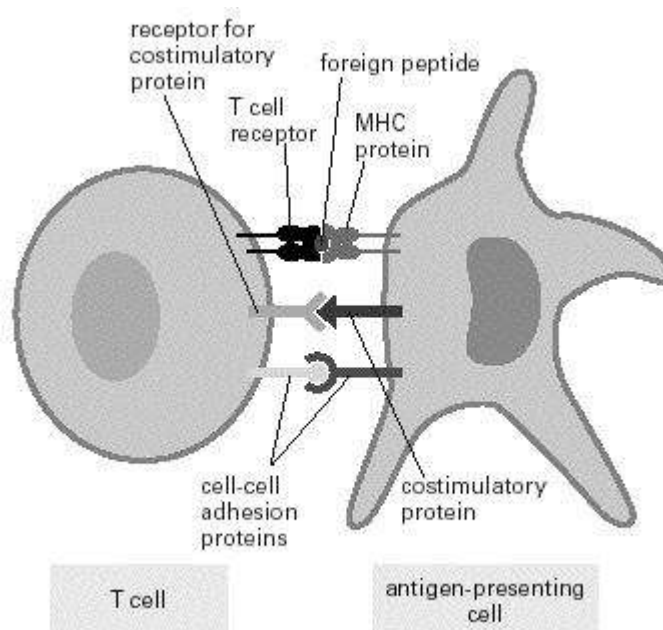
Auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), z.B. Monozyten und Makrophagen, befinden sich MHC-Klasse-II-Moleküle, die T-Helferzellen (CD4+T-Zellen) Peptidfragmente extra-zellulärer Proteine präsentieren. Sie bestehen ähnlich wie Klasse-I-Moleküle aus zwei Untereinheiten, α - und β -Kette, beide sind jedoch membrangebunden. Extrazelluläre Proteine werden durch Phago-/Endozytose aufgenommen und wiederum gespalten und zur Zelloberfläche gebracht, wo von T-Helferzellen geprüft wird, ob es sich um körpereigene Proteine handelt; stammen sie von Eindringlingen wie Makroparasiten, wird eine Immunreaktion ausgelöst.

Die MHC-Klasse-III-Moleküle gehören dagegen zur unspezifischen Immunabwehr und sind nicht membrangebunden.

Der MHC ist in seiner genetischen Variabilität herausragend, er liegt in einer Vielzahl verschiedener Allele vor, die sich vor allem in Codons für Aminosäuren an den Bindungsstellen unterscheiden, sodass Peptide verschiedener Schadorganismen präsentiert werden können

2.1 MHC beim Stichling

¹ T-Zellen, die an MHC-Moleküle mit körpereigenen Peptiden binden, werden in den ersten Lebensmonaten selektiert, ebenso T-Zellen mit zu geringer Bindung zu MHC-Molekülen (positive und negative Selektion)



Kommunikation zw. einer APC mit MHC II und T-

Beim dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*), dem Modellorganismus der AG für Evolutionsökologie, sind bis zu sechs Loci für MHC-Klasse-II-Gene für die β -Kette² je Fisch bekannt, die homo- oder heterozygot belegt sein können, sodass zwischen einem und zwölf Allelen vorkommen. Anders als vielleicht zu vermuten gilt nicht, dass eine möglichst große Zahl verschiedener Allele für die Fitness, hier also die Resistenz gegen Parasiten, optimal ist. Mehr Allele und damit mehr verschiedene MHC-Moleküle erhöhen die Selektionsrate für T-Zellen, weil mehr Selbstpeptide an MHCs gebunden werden können, mit denen T-Zellen keine Interaktion eingehen dürfen; sie sterben durch Apoptose und stehen dem Immunsystem nicht zur Verfügung. Aus diesen beiden gegenläufigen Tendenzen ergibt sich ein Optimum, dass bei fünf bis sechs³ Allelen je Fisch liegt, wie die Gegenüberstellung von Parasitenbefall und Allelzahl in Untersuchungen des MPI gezeigt hat. Der Parasitenbefall lässt sich dabei annäherungsweise als Funktionswert einer quadratischen Funktion abhängig von Allelzahl darstellen.

Insgesamt sind für den dreistachligen Stichling in Plön bisher bis zu 140 Allele bekannt, die durch Klonierung bestimmt worden sind.⁴

Neben der Zahl verschiedener Allele scheint auch die Qualität des Allels unter den aktuellen Konditionen eine bedeutende Rolle zu spielen: Verschafft ein Allel eine höhere Resistenz gegen einen aktuell vorherrschenden Parasiten, sind Träger dieses Allels unter evolutionsbiologischen Aspekten (in der Selektion) im Vorteil, also fitter.

2.2 MHC und Partnerwahl

Der Zusammenhang zwischen der MHC-Zahl und -Komposition und dem Verhalten in der Partnerwahl ist ein Forschungsschwerpunkt am MPI. Es wird dabei untersucht, ob und in wiefern der MHC Einfluss auf die Entscheidung des Weibchens, das bei Stichlingen das wählende Geschlecht ist, bei der Suche nach einem Partner hat. Dazu hat man paarungsbereite Weibchen in einer Fließkammer dem Wasser, das aus getrennten Tanks zweier männlicher Artgenossen stammt, ausgesetzt und beobachtet, in welcher Hälfte der Kammer es sich länger aufhält, zu welchem Männchen also eine höhere Affinität besteht. Es wird nämlich davon ausgegangen, dass die Tiere anhand von Duftstoffen Informationen zum MHC erhalten; visueller Kontakt wurde zu diesem Zweck ausgeschlossen.⁵ Anschließend sind alle Versuchstiere bzgl. des MHC genotypisch analysiert worden. Im Ergebnis war festzustellen, dass Weibchen tendenziell solche Fische bevorzugen, die ihre eigene MHC-Komposition optimal ergänzen, also so, dass die Nachkommen eine optimale

² Im Folgenden bezieht sich MHC immer auf diesen Ausschnitt aus dem MHC-Gen.

³ Die Spanne ergibt sich aus verschiedenen Werten z.B. für See- oder Flusspopulationen, weil der Parasitendruck im See höher ist.

⁴ Es gibt Gründe, auf die später eingegangen werden soll, die vermuten lassen können, dass diese Zahl etwas zu hoch angesetzt ist (in-vitro-Rekombination).

⁵ Auch visuelle Informationen können indirekt Aufschluss über den MHC geben, da u.U. der Gesundheitszustand und damit die Fitness erkannt werden können, auch über die Stärke von aufwändigen Balzsignalen (Geschlechtsmerkmalen), die nur von gesunden Tieren in voller Pracht gezeigt werden können.

Zahl von „qualitativ hochwertigen“ Allelen, die Resistenz gegen aktuell vorhandene Parasiten, besitzen.

3 Techniken der Typisierung

Im Wesentlichen gibt es vier Methoden, um Allele, z.B. beim Stichling, zu bestimmen, die sich in Aufwand, Qualität und Reproduzierbarkeit unterscheiden: Klonierung, DGGE, SSCP und RSCA. Während die Klonierung die einzige Möglichkeit ist, die DNA-Sequenz unmittelbar zu ermitteln, nutzt man bei den anderen Analysen Unterschiede in der Konformation der DNA, die auf Basenpaarunterschiede zwischen verschiedenen Allelen zurückzuführen sind. Im Folgenden soll kurz auf die verschiedenen Techniken eingegangen werden und RSCA und Klonierung, weil sie Hauptthemen des Praktikums waren, näher vorgestellt werden.

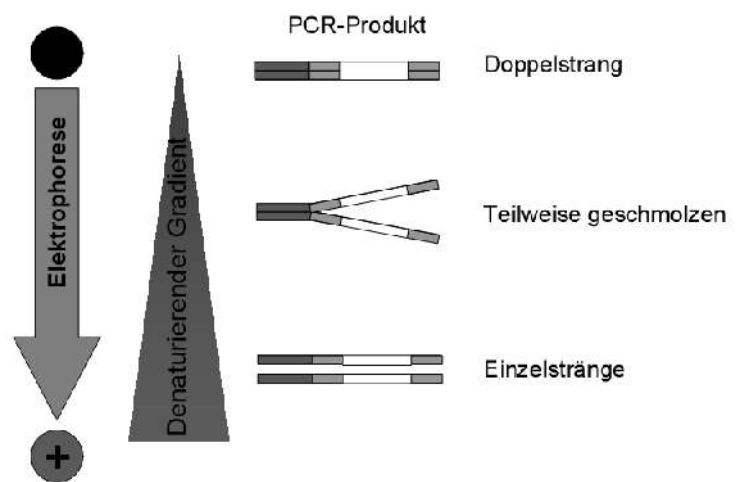
Für alle Methoden gilt, dass zunächst DNA i. d. R. aus Gewebe extrahiert und mittels PCR die MHC-Allele bzw. Ausschnitte daraus vervielfältigt (amplifiziert) werden müssen.

3.1 DGGE

Die DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) nutzt Unterschiede im Schmelzverhalten der DNA durch Basenpaarunterschiede. Um diese Unterschiede, die auch von einer einzelnen Punktmutation ausgelöst werden können, festzustellen, bedient man sich eines Gels mit Denaturierungsgradienten: Die Konzentration von denaturierendem Formamid und Harnstoff, die die DNA also in Einzelstränge auftrennen, nimmt vom Startpunkt der Gelelektrophorese in Laufrichtung zu. Abhängig von der Basenpaarsequenz werden manche Proben schon bei einem niedrigeren Denaturierungsgrad aufgespaltet. Da es sich bei der Denaturierung nicht um einen fließenden, sondern eher um einen schrittweisen Prozess

handelt, können auch Proben mit geringeren Unterschieden präzise aufgetrennt werden, auch diese unterscheiden sich in einem spezifischen Punkt, an dem das Fortkommen im Agarosegel endet.

Schmelzverhalten von PCR-Produkten

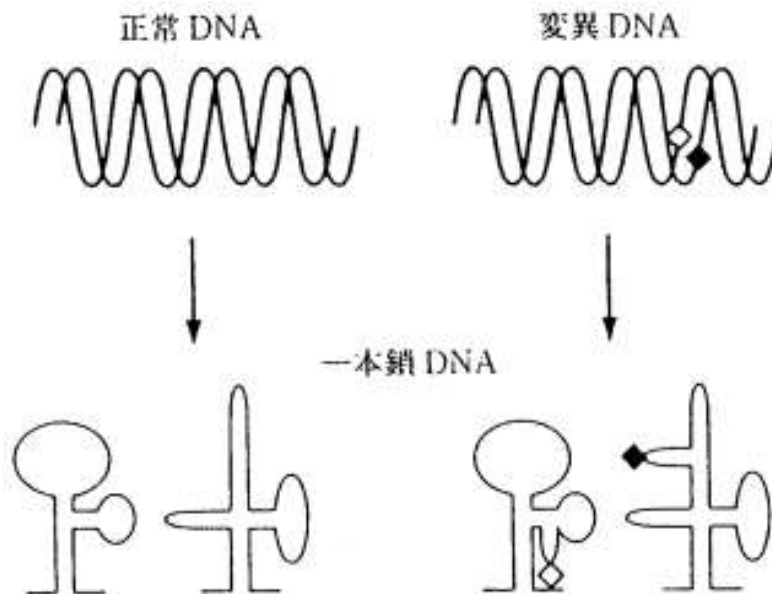


3.2 SSCP

Bei der SSCP (Single-strand confirmation polymorphism) wird die DNA aus der PCR aufgeschmolzen, d.h. durch Erhitzen werden die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen gelöst und die DNA liegt in Einzelsträngen vor. Anschließend werden diese sehr schnell abgekühlt, sodass sich komplementäre Stränge nicht wieder zusammenlagern können, sondern stattdessen eine eigene dreidimensionale Konformation annehmen, weil sich Wasserstoffbrücken zwischen Basen desselben Stranges ausbilden (ähnlich zur Kleeblattstruktur der tRNA).

Dieses Produkt wird in einem automatischen Sequencer analysiert, der mit einem nicht-denaturierendem Polymer, der die Konformation also nicht verändert, ausgerüstet ist. In diesem Sequencer wird eine Kapillar-Elektrophorese durchgeführt, sodass Unterschiede in der DNA-Sequenz, die die Konformation leicht verändern, zu verschiedenen großen „Widerständen“ in einem Polymer, mit dem die Kapillaren gefüllt sind, führen und damit auch zu unterschiedlich langen Laufzeiten. D.h., verschiedene Allele wandern unterschiedlich schnell durch den Polymer und erzeugen so bei der Detektion einzelne peaks.

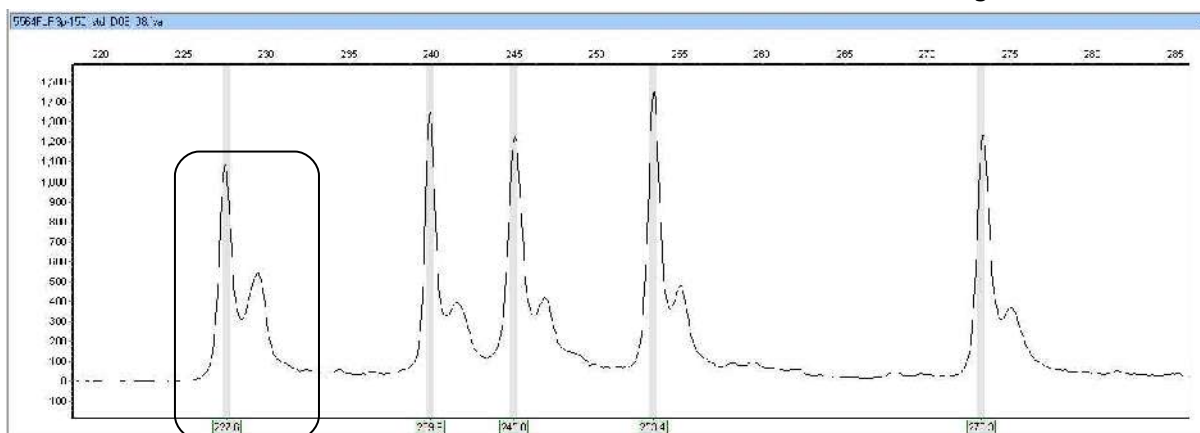
Diese Funktionsweise ist zwar mit relativ geringem Aufwand verbunden, birgt in der Praxis aber Probleme: Beim Abkühlen kann ein Allel u.U. mehr als eine Konformation annehmen und damit auch mehr als einen peak im Chromatogramm erzeugen, sodass die Zahl der Allele nicht immer mit Sicherheit bestimmt werden kann und die Ergebnisse das Kriterium der Reproduzierbarkeit nur eingeschränkt erfüllen.



Schematische Darstellung des Prinzips der SSCP. Als Quadrate dargestellt sind die Basen, die sich zwischen den beiden Allelen unterscheiden, unten die Auswirkung auf die Konformation des Einzelstranges.

3.3 RSCA

Die Reference strand-mediated conformation analysis ist die Methode, an der Tobias im Rahmen seiner Doktorarbeit arbeitet und an der ich während des Praktikums mitgewirkt habe. Neben der PCR mit der Proben-DNA wird dazu eine zweite DNA angesetzt, in der ein



Chromatogramm aus der Typisierung eines Fisches mittels RSCA. Gerahmt: Homoduplex. Jeder weitere (Doppel-)peak symbolisiert ein Allel

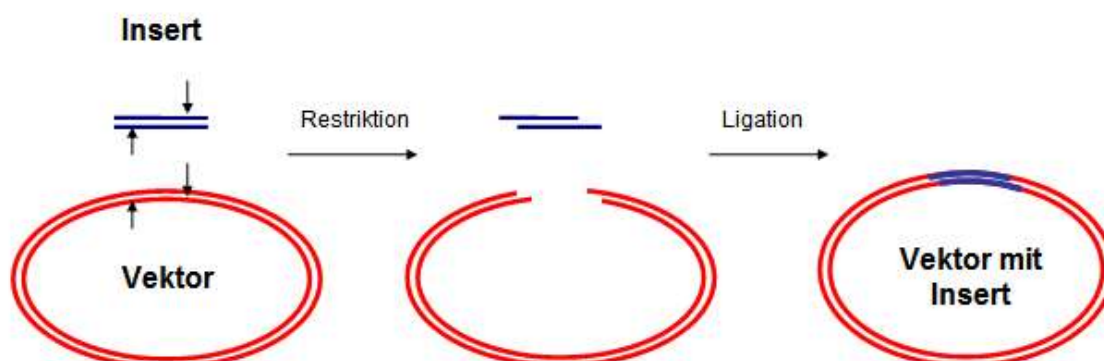
sog. Referenzallel amplifiziert und gleichzeitig fluoreszierend markiert wird. Im nächsten

Schritt wird Referenz und Probe vermischt, aufgeschmolzen und mit festgelegter Geschwindigkeit abgekühlt, sodass sich nicht nur die Ausgangsstränge von Referenz und Allelen wieder zusammenlagern, sondern auch Einzelstränge der Proben mit markierten Strängen der Referenz (Hybridisierung). Aufgrund von Basenpaarunterschieden zwischen Referenz und Allelen bildet sich für jedes Allel ein Heteroduplex bestimmter Konformation. Wie bei der SSCP nutzt man einen automatischen Sequencer mit nicht-denaturierendem Polymer, um die Heteroduplexe mittels Kapillar-Elektrophorese aufzutrennen und die Fluoreszenz durch einen Laser zu messen. Daraus ergibt sich ein Chromatogramm, das einen peak für den Homoduplex des markierten Referenzallels und für jedes Allel einen peak aufweist. Damit ist es möglich, die Zahl der Allele je Fisch zu bestimmen und, nach der Erstellung einer Datenbank mit gemessenen Laufzeiten bekannter Allele, die vorkommenden Allele zu bestimmen. Um bei der Vielzahl bekannter Allele eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen werden mehrere Referenzen in parallelen Reaktionen eingesetzt.

3.4 Klonierung

Die Klonierung unterscheidet sich grundsätzlich von den vorgenannten Methoden, weil sie nicht auf einem indirekten sondern einem unmittelbaren Nachweis von Basenpaarunterschieden beruht, d.h. nicht das Verhalten der DNA (im Gel) sondern die DNA selbst wird untersucht. Die Schwierigkeit dabei, die das Verfahren aufwändig und teuer macht, liegt in der Isolation der Allele, denn bei der Sequenzierung der DNA darf immer nur ein einzelner Alleltyp vorliegen. Um die Allele zu separieren bedient man sich lebender Organismen, die immer nur ein Allel zur gleichen Zeit aufnehmen können.

Die aus dem Gewebe extrahierte DNA wird dazu in der PCR amplifiziert, sodass nur die gewünschten Ausschnitte aus dem MHC-Gen vorliegen. Anschließend muss das Produkt in einen sog. Vektor, einen bakteriellen Plasmid, eingebaut werden, mit dem es vom Bakterium aufgenommen werden kann. Die Verbindung von Plasmid und PCR-Produkt erfolgt, indem beide mit Restriktionsenzymen geschnitten werden - dabei entstehen sticky ends: einzelsträngige DNA, die mit komplementären Enden „verklebt“ werden kann; dies geschieht mit Hilfe einer Ligase. Neben dem gewünschten DNA-Ausschnitt enthält der Plasmid weitere Gene, z.B. für Antibiotikaresistenz oder einen Farbstoff, sodass kontrolliert werden kann, ob der Plasmid vom Bakterium aufgenommen worden ist. Die Absorption des Plasmids durch Bakterien geschieht durch natürliche Mechanismen oder nach einer



entsprechenden Vorbehandlung. Im Anschluss daran werden die Bakterien auf evtl. mit Antibiotika behandelte Agarplatten ausgebracht, um dort Kolonien zu bilden. Ist das Wachstum ausreichend, können die farblich markierten bzw. die resistenten Kolonien „gepickt“ werden, d.h. man nimmt Proben, aus denen die DNA dann extrahiert werden kann. In der aufgereinigten DNA werden alle Basen fluoreszierend markiert, jede der vier Basen mit einer Farbe, und in einem automatischen Sequencer mit einem Laser abgelesen, in einem Chromatogramm dargestellt und die Basensequenz benannt; wären in diesem Schritt mehrere Allele in einem Reaktionsansatz vorhanden, gäbe es kein eindeutiges Chromatogramm. So erhält man die genaue Sequenz aller vorhandenen Allele.

4 Meine Aufgaben

Wie bereits erwähnt war ich während meines Praktikums überwiegend mit der Arbeit an der RSCA beschäftigt. Dabei galt es Ergebnisse einer Klonierung, die Tobias vor meinem Praktikum durchgeführt hatte, auszuwerten und die Typisierung derselben Fische dann mit der RSCA zu wiederholen und die Resultate zu vergleichen. In der ersten Praktikumswoche lag das Hauptaugenmerk aber noch auf einem anderen Themengebiet: dem Vergleich des MHC von dreistachligem und neunstachligem Stichling (*Pungitius pungitius*).

4.1 MHC II bei *Gasterosteus ac.* und *Pungitius pu.*

Hintergrund dieses Projekts ist die Annahme, dass Fische verschiedener verwandter Arten trotz der Vielzahl möglicher Allele im gleichen Habitat über Artgrenzen hinweg ähnliche Allele aufweisen, weil sie den gleichen Parasiten und damit denselben Selektionsfaktoren ausgesetzt sind. Ich erhielt von Tobias 40 *Pungitius*-Sequenzen, die er in oben genannter Klonierung erhalten, aber noch nicht ausgewertet hatte, um sie mit dem Genom des *Gasterosteus* zu vergleichen. Dazu musste ich die Chromatogramme, die der Sequencer erstellt hatte, betrachten, (a) um festzustellen, ob die Qualität des Chromatogramms zufrieden stellend ist, keine Schattenbilder in Form von doppelten peaks auftreten, (b) um die gesuchte Sequenz auszuschneiden - sie ist ja in den Plasmiden eingebettet, der mit abgebildet wird - und (c) zur Sammlung in eine Datei zusammenzuführen.

Für den weiteren Vergleich zwischen *Gasterosteus* und *Pungitius* waren nun Individuen beider Arten aus dem gleichen Habitat zur gleichen Zeit zu fangen und zu klonieren.

Im nächsten Schritt konnte ich mit einer erst seit wenigen Wochen publizierten Datenbank arbeiten, die das gesamte Genom von *Gasterosteus* umfasst und von Individuen aus Alaska gewonnen wurde. Dort kann man eine eigene DNA-Sequenz einfügen und Übereinstimmungen suchen lassen („eine Sequenz blasten“). Und trotz der großen Variabilität des MHC ließen sich homologe Abschnitte finden, die als MHC II identifiziert worden waren und sich nur in wenigen Basenpaaren unterscheiden. Auch das konnte so nicht erwartet werden, weil davon ausgegangen werden muss, dass die Habitate zwischen Plön und Alaska sich genauso deutlich unterscheiden, wie die Parasiten, die als Selektionsfaktor auf den MHC wirken; durchaus kein Hindernis für das Projekt.

Doch das Fangen gestaltete sich schwierig: In der Malenter Au, einem Bach in der Nähe von Plön, konnten wir nur wenige Jungtiere abfischen. Aus diesem Grund stellten wir noch am selben Tag sowohl im Großen Plöner See als auch in der Malenter Au einige Reusen auf, für den Fall, dass sich die Stichlinge in einem anderen Abschnitt des Bachs aufgehalten hatten. Unsere Hoffnungen waren aber gedämpft, weil die älteren Tiere im Sommer, nach der Aufzucht der Jungtiere, in der Regel absterben. Die Jungtiere wären nicht geeignet, da sie den Parasiten noch nicht lange genug ausgesetzt waren, um Informationen zum Befall liefern zu können; wenige ältere Tiere wären nicht repräsentativ genug gewesen.

4.2 Fortentwicklung der RSCA

Statt an dem Projekt zum Pungitius arbeitete ich zusammen mit Tobias an der RSCA. Konkret bedeutet das, dass wir die Ergebnisse der Klonierung von elf Fischen auszuwerten hatten. Zunächst mussten die Daten des Sequencers wie oben beschrieben bearbeitet werden, um dann Klone, die dasselbe Allel repräsentieren, zu gruppieren und mit der Datenbank bereits bekannter Allele zu vergleichen, sodass sie benannt werden und die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst werden können. Die Auswertung aller über 800 Sequenzen setzte sich mit Tests zu den verwendeten Primern und dem Vergleich mit der RSCA fort und erstreckte sich über einige Zeit.

Es werden im Wesentlichen vier Ziele verfolgt, die mit der Methode abgedeckt werden sollen:

1. Feststellen, wie viele Allele in einem Fisch vorkommen,
2. Auswerten, welche Allele häufig in einer Population vorkommen,
3. Erkennen gleicher Allele bei verschiedenen Fischen,
4. Identifikation der in einem Fisch vorkommenden Allele.

Interessant im Hinblick auf die Weiterentwicklung der RSCA waren dann Fragen wie:

- Kann es gelingen, Allele mit wenigen Basenpaar-mismatches zu unterscheiden?
- Werden alle/häufige Allele zuverlässig abgebildet? Gibt es eine Korrelation zwischen Klonierung und RSCA?
- Sind die Daten (Chromatogramme) einfach/eindeutig auszuwerten?

Die Aufgaben, die dazu erledigt werden mussten, wiederholten sich dabei: Zunächst musste die DNA mit Hilfe eines DNA-Extraktions-Kits aus Gewebeproben gewonnen und mittels PCR amplifiziert werden, ein Gel gegossen und eine Gelelektrophorese durchgeführt werden sowie das Gel gefärbt, um den Erfolg der PCR zu prüfen. Die Referenzallele werden in einer PCR mit fluoreszenzmarkierten Forward-Primern hergestellt und in der Hybridisierung mit der Proben-DNA zusammengebracht, um dann für den Sequencer⁶ vorbereitet zu werden, also mit einem Längenmarker versehen und in Platten gefüllt. Insgesamt bedeutet das viel Pipettierarbeit im Mikroliterbereich und die Notwendigkeit eines guten Zeitplans, um Wartezeiten, in denen die Arbeit von Thermocycler oder Sequencer übernommen wird, gut zu nutzen.

In der Auswertung der RSCA-Chromatogramme gilt es in GeneMarker zunächst die Rohdaten aneinander anzugleichen, d.h. die peaks des Längenmarkers den Werten der Vorlage anzugleichen, um die Vergleichbarkeit der Laufzeiten zwischen Läufen zu. Die anschließende Betrachtung richtet sich nach der Fragestellung.

⁶ Verwendet wird derselbe Sequencer, der auch für die Bestimmung der Basenpaarsequenz verwendet wird, aber mit einem anderen Polymer ausgerüstet ist.

Identifizierung ähnlicher Allele

Aus dem Polymorphismus auf dem kurzen Ausschnitt des MHC II ergibt sich, dass sich einige Allele nur in wenigen bzw. einer Base unterscheiden. Zu prüfen ist deshalb, ob sich die Konformation der Hybride aus Referenzallel und den ähnlichen Allelen ausreichend unterscheidet, um in der Elektrophorese im Sequencer aufgetrennt zu werden und damit im Chromatogramm jeweils einen eigenen peak zu erzeugen. Aus vorangegangenen Tests ist bekannt, dass eine Referenz nicht immer verschiedene Werte⁷ für verschiedene Allele liefert. Darum finden für die eindeutige Identifikation drei Referenzallele Verwendung.

Für die Überprüfung der Auflösung suchten wir Allele mit bis zu vier Basenpaarunterschieden aus einer Sammlung klonierter Allele (Plasmid-DNA), die wir sowohl einzeln als auch in Mischung verarbeiteten (PCR, Hybridisierung, RSCA). Wie das Beispiel zeigt, können Allele, die bei einer Referenz gleiche Laufzeiten aufweisen und, wenn sie gemeinsam vorkommen, deshalb nicht identifiziert werden - die peaks überlagern sich - sich bei einer zweiten Referenz aber deutlich unterscheiden.

Ermittlung der Zahl von Allelen

Ob mittels RSCA alle Allele gefunden werden, kann nur im Vergleich mit dem Ergebnis der Klonierung festgestellt werden. Dafür verwendeten wir Gewebeproben der für die Klonierung verwendeten Fische, extrahierten DNA und nutzten diese für die RSCA; die Referenzen mussten ebenfalls wieder hergestellt werden. Zusätzlich testeten wir die in der Klonierung identifizierten Allele einzeln, um Bezugswerte für die Identifizierung zu erhalten. Die Ergebnisse des Vergleichs der Daten mit denen der Klonierung waren gemischt: Bei einigen Fischen konnten alle Allele gefunden und identifiziert werden, bei anderen wurde nur ein Teil der Allele abgebildet (Beispiele siehe Anhang). Auf der Suche nach dem Problem, dass z.T. zu wenige peaks auftreten, rückten zwei Fragen in den Vordergrund:

- Weisen die fehlenden Allele die Sequenz eines modifizierten Reverse-Primers auf? (Wir hatten nur den Standard-Primer verwendet.)
- Wie verlässlich ist das Ergebnis der Klonierung?

Im Fall der Primer gibt es beim MHC einige Besonderheiten: Wegen dessen großer Variabilität gibt es keinen Reverse-Primer, der zu allen Allelen vollständig komplementär ist. Doch sowohl in vorangegangenen als auch neueren Tests, konnten wir nicht feststellen, dass Allele mit abweichender Sequenz regelmäßig schlechter amplifiziert werden. Auch bei der Klonierung, für die zwei Reverse-Primer verwendet worden waren, ist kein Allel aufgetreten, das mit Sicherheit nur von einem der beiden amplifiziert wird.

⁷ „Laufzeiten“: die vergangene Zeit zwischen Start der Elektrophorese und Messung des Substanz in der Detektionseinheit, einem Laser, in der sich verschiedene Allele bzw. deren Hybride unterscheiden

Bei der Klärung der zweiten Frage fiel auf, dass manche Allele in der Klonierung von nur einem oder wenig mehr Klonen (von 96 je Fisch) repräsentiert wurden. Ein möglicher Grund für diesen Effekt ist in-vitro-Rekombination, d.h. in der PCR kann sich ein bei der Elongation nicht vollständig fertig gestelltes Allel an ein anderes, im synthetisierten Abschnitt komplementäres Allel anlagern und wirkt für dieses als Primer, unabhängig davon, ob die beiden Ausgangsallele im noch fehlenden Bereich übereinstimmen. So kann ein neues Allel entstehen, von dem man nicht weiß, ob es durch künstliche oder natürliche Rekombination, z.B. ein crossing-over, entstanden ist. Die Betrachtung der gefundenen Sequenzen hat gezeigt, dass maximal 5 der 15 Allele als Rekombinanten dargestellt werden können. Bis

Möglicher Ablauf der in-vitro-Rekombination

1. Unvollständige Elongation von Allel 1, Abbruch bei Ende des Zyklus

Allel 1:

TTTGTGGCTTCACTGAACAAGGAGTGAAGAACGCTGAATACTGGAACAACGACCCTTCAAACCTGAGTGCTATGAAGGCTCA
AAACAGCCGAAGTGACTTGTTCTCACTTCTTGCGACTTATGACCTTG

2. Anlagerung an ein ähnliches Allel 2, Fortsetzung der Elongation

AAACAGCCGAAGTGACTTGTTCTCACTTCTTGCGACTTATGACCTTGTTGCTGCGAAGTGAAGACTCACCTCTCTT
CCGAGT

Allel 2:
TTTGTGGCTTCACTGAGTACGGAGTGAGGAACGCTGAATACTGGAACAACGACGCTTCACTTCTGAGTGGAGAGAAGGCTC
A

zum Ende des Praktikums konnten wir nicht feststellen, wie viele Allele in allen Fischen tatsächlich durch in-vitro-Rekombination entstanden sind. Aufklärung könnte eine Wiederholung der Klonierung bringen, bei der nur Allele, die dort wieder identifiziert werden, als existierend betrachtet werden.

Trotz dieser Unsicherheit ergab die statistische Prüfung, dass die Ergebnisse von Klonierung und RSCA in Korrelation zueinander stehen bzw. dass die Korrelation hochsignifikant ist.

Ausblick

Zur weiteren Verbesserung der Methode haben wir in Betracht gezogen, einen „längeren“ Längenmarker zu verwenden, der eine größere Zahl von Allelen mit langer Laufzeit abdeckt. Damit sollten die gewonnenen Werte vor allem in diesem Bereich präziser werden und beobachtete Verschiebungen minimiert.

Die Signalqualität und damit die Ablesbarkeit der Chromatogramme ist i.d.R. zufrieden stellend, manchmal aber noch etwas schwankend. Ob es erreicht werden kann, bei jedem Fisch eine ausreichende Zahl von Allelen aufzuspüren ist schwer abzusehen und kann evtl. nach der erneuten Klonierung besser beurteilt werden.

Insgesamt erscheint die RSCA trotz der beschriebenen Schwierigkeiten aussichtsreich, um bei der Typisierung u.a. von MHC-Allelen als Routine-Methode eingesetzt werden zu können, sobald die Qualität der Ergebnisse zuverlässig ist. Vor allem in Anbetracht der Probleme, die bei der Klonierung auftreten können und ihres hohen Aufwands, müssen die Resultate

als äußerst zufrieden stellend angesehen werden, zumal die gestellten Aufgaben (s.o.) wohl in absehbarer Zeit erfüllt werden können.

4.3 Weitere Erfahrungen

Neben der Arbeit mit der RSCA war ich an der Pflege einer Fischzucht für einen Freilandversuch im nächsten Jahr beteiligt. Dafür werden die Nachkommen verschiedener Kreuzungen in Tanks von je 20 Litern gehalten. Nach dem Umsetzen von 20 wenige Wochen alten Jungtieren aus jeder Linie mussten die Tanks regelmäßig gereinigt und auf tote Tiere kontrolliert werden - als Abwechslung zu der Arbeit im Labor und am PC willkommene Aufgaben. Gegen Ende des Praktikums waren die Stichlinge groß genug, um mit zusätzlichem Lebendfutter - vom Salzwasser gereinigten Artemien aus eigener Zucht - versorgt zu werden: auch im Wochenenddienst zu zweit keine allzu anstrengende Arbeit.

5 Fazit

Insgesamt haben mir die gut vier Wochen in Plön viel Spaß gemacht. Ich konnte nicht nur umfassende Einblicke in die aktuelle Arbeit am Institut bekommen und etwas routinierter in der Laborarbeit werden. Auch die Arbeitsweise mit flexiblen Arbeitszeiten, die Planung der Experimente und die Arbeitsumgebung kennen zu lernen, war sehr interessant. Dabei haben sich einige Versuche als langwieriger herausgestellt, als ich durch mein theoretisches Vorwissen aus der Schule vermutet hätte. In der praktischen Arbeit konnte ich schrittweise mehr Aufgaben übernehmen und fühlte mich so nie überfordert, wie ich es im Voraus vielleicht befürchtet hatte. Ich habe mich von Anfang an willkommen gefühlt und hatte mit Tobias einen „Lehrer“, der sich Zeit für

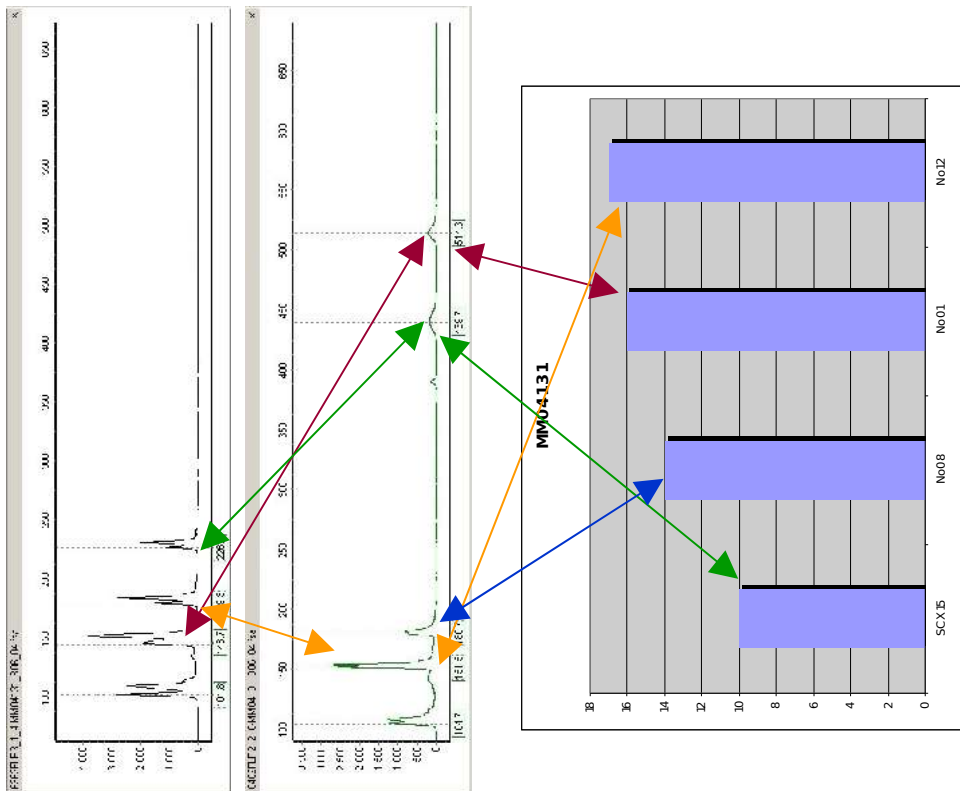
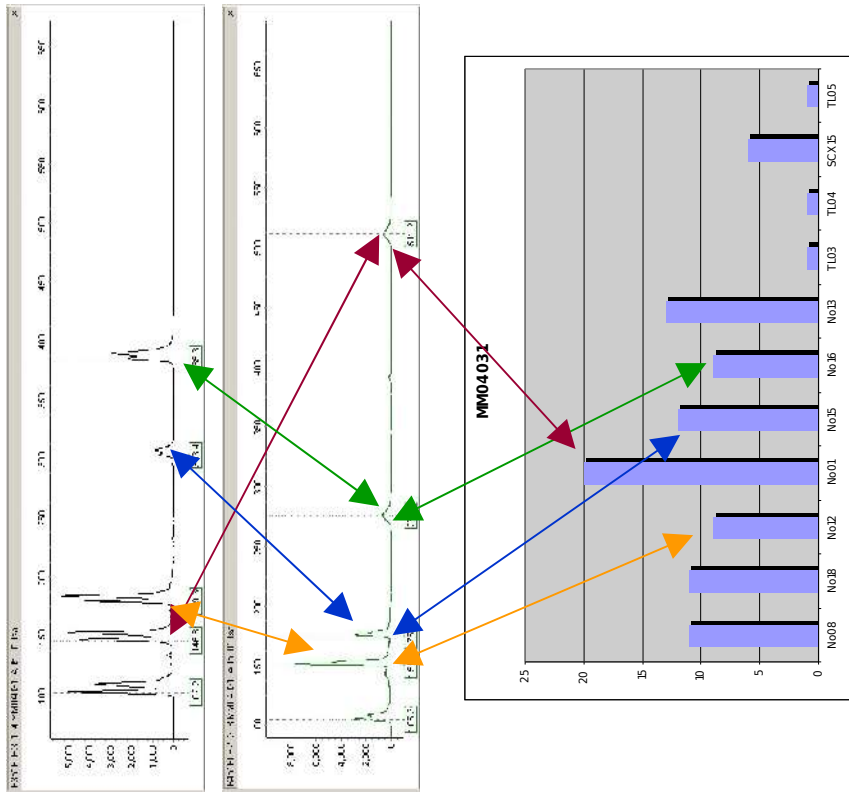


Erklärungen genommen und mir viel von seinen Erfahrungen vermittelt hat.

Daneben hat mich das Praktikum nachträglich in meiner Studienentscheidung bestätigt, mich auf den mikrobiologischen Bereich zu konzentrieren und mir eine zusätzliche Motivation für die zahlreichen Theoriestunden im Grundstudium gegeben und mich auch sonst gut auf das Studium vorbereitet. So konnte ich in Plön am Leben in einer internationalen WG mit Forschungsmitarbeitern teilhaben und einige Tipps für die molekularbiologische Arbeit mitnehmen.

Abschließen möchte ich mich noch mal bei allen Mitarbeitern des Instituts, aber bei Tobias im Besonderen für die freundliche Aufnahme und die Ermöglichung des Praktikums bedanken. Mein Dank gilt auch dem Förderverein der Biologieolympiade, der mir das Praktikum vermittelt und mich in Zusammenarbeit mit dem vdbiol finanziell unterstützt hat.

Anhang



Vergleichende Auswertung von RSCA und Klonierung.

oben: RSCA-Chromatogramme für einen Fische je mit 2 Referenzen, erster peak → Homoduplex
 unten: Häufigkeit in der Klonierung repräsentierter Allele

Die Pfeile zeigen die peaks bzw. Säulen gleicher Allele, identifiziert und zugeordnet anhand ihrer bekannten Laufzeit. Aus den rechten Abbildungen kann man ablesen, dass nicht alle der in der Klonierung repräsentierten Allele mittels RSCA abgebildet worden sind. Außerdem kann in diesen Diagrammen eine Schwankung in der peak-Höhe festgestellt werden.

Quellen

Milinski, M., Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 2006, 37: The Major Histocompatibility Complex (MHC), Sexual Selection, and Mate Choice.

Drábek, J., Electrophoresis 2001, 22, 1024-1045

www.wikipedia.de

www.mpil-ploen.mpg.de

hg.wustl.edu/hdk_lab_manual/dgge/dgge1.html

www.homepages.ucl.ac.uk/.../Essay2/TCR-MHC.jpg

www.jpo.go.jp/.../kakusan/image/Image1424.gif

Protokoll

DNA-Extraktion und Gelaufreinigung:

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/GenomicDNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantIssues/DNY_BloodTissue/1037951_HB_DNY_Blood_Tissue_062006_Web.pdf

Weitere Informationen

Grundlegende Methoden der Mikrobiologie (PCR, Gelelektrophorese, u.a.):

<http://www.icbm.de/pmbio/pr/meth05/Mobi-Vorlesung.pdf>

T-Zell-Entwicklung und -Selektion

<http://www.immunologie.uni-luebeck.de/documents/lehre/T-Zellenentwicklung.pdf>